

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

"Харківський політехнічний інститут"

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до лабораторних занять з курсу

**«ОСНОВИ БІОХІМІЇ ХАРЧОВИХ І КОСМЕТИЧНИХ
ВИРОБНИЦТВ»**

2018

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

"Харківський політехнічний інститут"

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
до лабораторних занять з курсу
«ОСНОВИ БІОХІМІЇ ХАРЧОВИХ І КОСМЕТИЧНИХ
ВИРОБНИЦТВ»

для студентів зі спеціалізації

161.10 «Хімічні технології харчових добавок
та косметичних засобів»

Затверджено

Вченою радою

Навчально-наукового інституту
хімічних технологій та інженерії,
протокол № 5 від 27.06.2018 р.

Харків

НТУ «ХПІ»

2018

Укладачі: В.В. Анан'єва,
А.П. Белінська,
Т.О. Овсяннікова,
С.О.Петров,
С.В. Жирнова

Рецензент: О.О. Варанкіна

Кафедра органічного синтезу і нанотехнологій

Методичні вказівки до лабораторних занять з курсу «Основи біохімії харчових і косметичних виробництв» для студентів спеціалізації 161.10 «Хімічні технології харчових добавок та косметичних засобів» денної та заочної форм навчання / уклад.: В.В. Анан'єва, А.П. Белінська, Т.О. Овсяннікова, С.О. Петров, С.В. Жирнова - Х.: НТУ «ХПІ», 2018. - 48 с.

ВСТУП

Оволодіння сучасними методами біохімічних досліджень представляє важливий етап підготовки інженера-технолога, який планує працювати на підприємствах харчових і косметичних виробництв. Найважливіше місце в структурі фізико-хімічної біології займає біохімія, наука про механізми метаболічних процесів і їх регуляції. Біохімія представляє науку про молекулярні основи життя, вивчає процеси, що визначають фізіологічні явища, а також патологічні стани. Стає все більш очевидним існування загальних принципів, що визначають структуру, взаємодію, функціональну активність біологічних молекул і надмолекулярних структур. Прямий біохімічний експеримент дозволяє зрозуміти взаємозв'язок характеристик первинних молекулярних біохімічних реакцій і складних кінцевих біологічних явищ.

Знайомство з принципами методів біохімічних і біофізичних досліджень, вміння їх самостійно застосовувати та інтерпретувати отриманий результат необхідні для розуміння досягнень сучасної біохімії, біофізики, молекулярної біології, біоорганічної хімії.

У цих методичних вказівках описані лабораторні роботи, призначені для студентів спеціалізації 161.10 «Хімічні технології харчових добавок і косметичних засобів», і дозволяють отримати уявлення про структуру та властивості біологічних молекул і макромолекул, в тому числі ферментів, про основні біологічні процеси, структури та стабільності мембран, особливості перебігу біохімічних реакцій.

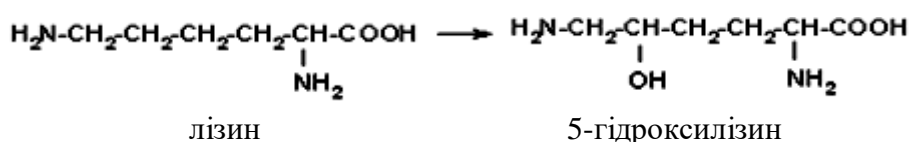
Завданнями методичних вказівок є вивчення важливих біологічних процесів, властивостей біологічних структур, принципів якісного та кількісного аналізу біомолекул, подолання розриву між теоретичними знаннями і практичним творчим використанням сучасних фізико-хімічних методів.

РОЗДІЛ 1. БІЛКИ

Білки, або протеїни (в перекладі з грецького означає «перші»), присутні у всіх клітинах. На їх частку у тварин припадає близько половини сухої маси, у рослин - 20-35%. У білках масова частка вуглецю в середньому становить ~ 50%, водню ~ 7%, кисню ~ 23%, азоту ~ 16%, сірки ~ 1-3%. У їх складі також зустрічаються і інші хімічні елементи.

Білки - найбільш численні і виключно різноманітні за функціями макромолекули, які відіграють фундаментальну роль у формуванні та підтримці структури і функцій живих організмів. З білками в живому організмі пов'язані такі біологічні процеси, як ріст, ділення, розмноження і розвиток клітин, реалізація спадкової інформації, м'язові скорочення, нервова діяльність, обмін речовин і т.д.

Білки - це високомолекулярні біополімери, структурну основу яких складають поліпептидні ланцюги, що складаються з амінокислотних залишків, пов'язаних один з одним пептидним зв'язком. При їх гідролізі утворюються амінокислоти. У складі білків зустрічаються двадцять стандартних амінокислот. Для кожної стандартної амінокислоти існує генетичний код, за допомогою якого в генах записана інформація щодо кодованого білка. Крім двадцяти стандартних амінокислот, в складі білка зустрічаються і інші амінокислоти, вони утворюються в результаті модифікації стандартних амінокислот, після того як останні були включені до складу молекули білка. Наприклад, в складі білка колагену міститься 5-гідроксилізін, який утворюється в результаті модифікації стандартної амінокислоти лізину:



Крім амінокислотних залишків, до складу білків можуть входити і інші компоненти: йони металів, вуглеводи, ліпіди, нуклеїнові кислоти та ін. Різноманіття білків визначається не тільки їх якісним складом, але й числом амінокислотних залишків, і перш за все порядком їх чергування в молекулі. Потенційно різноманітність білків безмежна.

Між амінокислотними залишками в молекулі білка існують різноманітні хімічні взаємодії, це - ковалентні, йонні, водневі зв'язки, гідрофобні взаємодії, ван-дер-ваальсові сили.

Зазначені вище хімічні зв'язки і взаємодії беруть участь у формуванні структури білкових молекул. Завдяки пептидним зв'язкам утворюються

Білки виконують різноманітні функції. У зв'язку з цим серед них розрізняють структурні, поживні, запасні, транспортні, каталітичні, захисні, рецепторні, регуляторні та ін. білки.

КОЛЬОРОВІ РЕАКЦІЇ НА БІЛКИ

Присутність білків в біологічних об'єктах або розчинах можна визначити за допомогою кольорових реакцій, протікання яких обумовлено наявністю в білку специфічних груп і пептидних зв'язків.

• водний розчин яєчного білка (білок одного курячого яйця відокремлюють від жовтка, розчиняють в 15-20-кратному об'ємі дистильованої води, потім розчин фільтрують через марлю, складену в 3-4 шари, і зберігають в холодильнику);

- $$\left[\begin{array}{c} \text{R}_1 \quad \text{O}^- \quad \text{R}_2 \quad \text{O} \quad \text{R}_3 \\ | \quad // \quad | \quad // \quad | \\ -\text{NH}-\text{CH}-\text{C}=\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}-\text{C}- \\ | \quad \quad \quad | \quad \quad \quad | \quad \quad \quad | \\ \text{R}_6 \quad \text{O} \quad \text{R}_5 \quad \text{O}^- \quad \text{R}_4 \end{array} \right]^{2-} \quad 2\text{Na}^+$$

Завдання 1. Біуретова реакція.

У лужному середовищі білки, а також продукти їх гідролізу - пептиди дають фіолетове або червоно-фіолетове забарвлення з солями міді. Реакція зобов'язана наявності пептидних зв'язків в білках.

Інтенсивність забарвлення залежить від довжини поліпептиду.

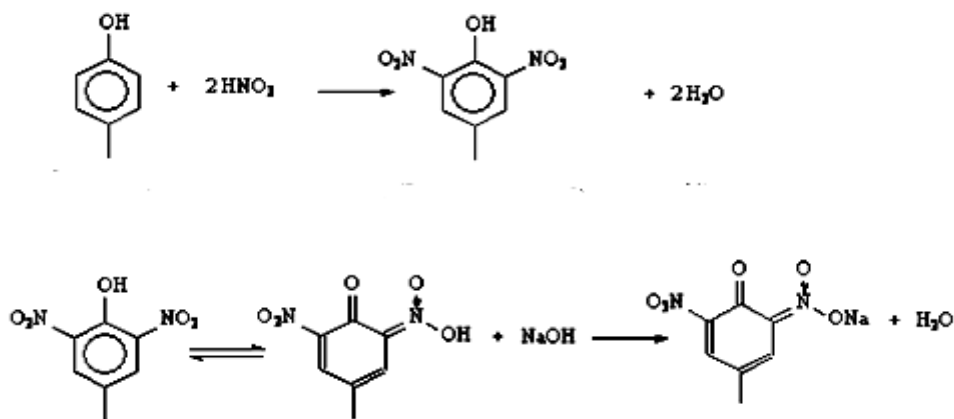
Хід роботи:

У пробірку налейте 5 крапель розчину яєчного білка, потім 10 крапель 10,0% -го розчину лугу.

Додайте 1-2 краплі розчину сульфату міді, суміш перемішайте. З'являється червоно-фіолетове забарвлення.

Завдання 2. Ксантопротеїнова реакція.

Реакція характерна для деяких ароматичних амінокислот (фенілаланіну, тирозину, триптофану), а також для пептидів, що їх містять. При дії азотної кислоти утворюються нітросполуки жовтого кольору. Далі нітропохідні можуть реагувати з лугом з утворенням натрієвої солі, що має жовто-гаряче забарвлення:



Хід роботи:

Дану роботу необхідно виконувати у витяжній шафі, дотримуючись особливої обережності!

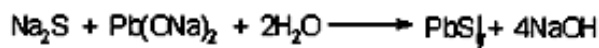
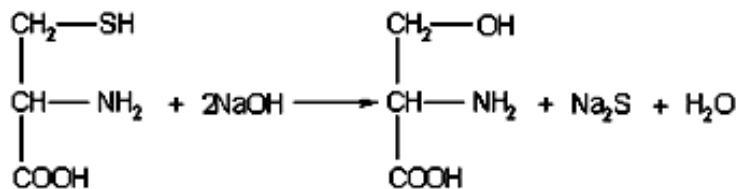
У пробірку налейте 5 крапель розчину яєчного білка і ОБЕРЕЖНО по стінці додайте 3-4 краплі концентрованої азотної кислоти.

Суміш обережно нагрійте. Випадає осад, який забарвлюється в жовтий колір.

Після охолодження в пробірку ОБЕРЕЖНО по стінці прилійте 10 крапель 30,0% -го розчину NaOH, жовте забарвлення переходить в помаранчеве.

Завдання 3. Реакція на сірковмісні амінокислоти (реакція Фоля).

У залишках сірковмісних амінокислот цистеїну та цистину сірка при лужному гідролізі відщеплюється, утворюючи сульфіди. Сульфіди, взаємодіючи з ацетатом свинцю, утворюють осад сульфіду свинцю чорного або буро-чорного кольору:



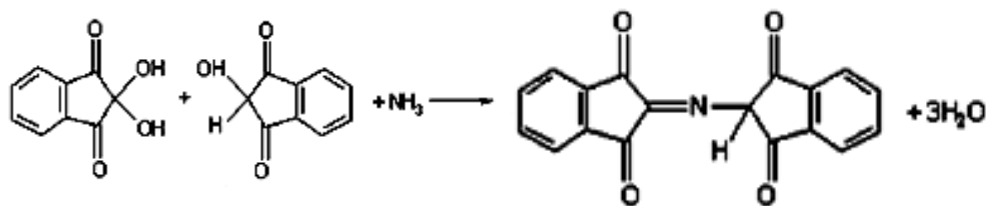
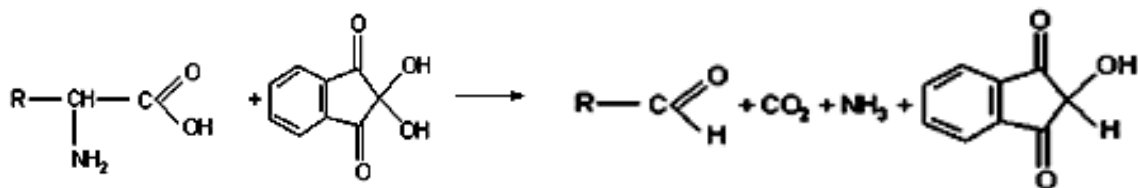
Хід роботи:

У пробірці змішайте 5 крапель розчину яєчного білка, 5 крапель 30,0% -го розчину лугу і 2 краплі розчину ацетату свинцю.

Суміш обережно нагрійте до кипіння і кип'ятіть. Через деякий час з'являється буро-чорне або чорне забарвлення.

Завдання 4. Нінгідрінова реакція.

Реакція характерна для аміногруп в α -положенні і обумовлена наявністю α -амінокислот в молекулі білка. При нагріванні білка з водним розчином нінгідрину амінокислоти окиснюються і розпадаються, утворюючи двоокис вуглецю, аміак і відповідний альдегід. Відновлений нінгідрин конденсується з аміаком і окисненою молекулою нінгідрину, утворюючи сполуку фіолетово-синього кольору:



В пробірку вносять 5 крапель 1,0% -го розчину яєчного білка, додають по 3 краплі 0,5% -го розчину нінгідрину і нагрівають до кипіння. Через 2-3 хвилини з'являється рожеве, червоне, а потім синьо-фіолетове забарвлення.

Оформлення результатів.

Оформіть проведені дослідження у вигляді таблиці.

№ завдання	Умови проведення реакції	Явище, що спостерігають	Реакції, що протікають	Висновок

Лабораторна робота № 2

РЕАКЦІЇ ОСАЖДЕННЯ БІЛКІВ

Мета роботи - ознайомитися з реакціями осадження білків дією різних хімічних реагентів.

Реакції осадження білків бувають зворотними та незворотними. При зворотньому осадженні макромолекули білка в основному не піддаються глибокої денатурації, а осадки можуть бути знову розчинені в первинному розчиннику. Зворотнє осадження викликається дією нейтральних солей амонію, лужних і лужно-земельних металів (висолювання), спирту, ацетону, ефіру і деяких інших органічних розчинників.

При незворотньому осадженні відбувається глибока денатурація і агрегація білка. Денатурований білок не здатний до відновлення своїх початкових фізико-хімічних і біологічних властивостей. Незворотнє осадження викликається високою температурою, дією концентрованих мінеральних і деяких органічних кислот, йонів важких металів, алкалоїдних реагентів, детергентів, барвників.

Реактиви та обладнання:

- розчин яєчного білка з додаванням хлориду натрію (білок одного курячого яйця відокремлюють від жовтка і розчиняють в 230 см³ дистильованої води, до якої додають 100 см³ насиченого розчину хлориду натрію, розчин фільтрують через марлю, складену в 3-4 шари, і зберігають в холодильнику);
- насичений розчин сульфату амонію;
- сульфат амонію, розтертий в порошок;

- 10,0 %-й розчин гідроксиду натрія;
- 1,0 %-й розчин сульфату міді;
- концентровані сірчана, соляна та азотна кислоти;
- 5,0 %-й розчин ацетату свинця;
- 2,5 %-й розчин нітрата срібра;
- 5,0 %-й розчин сульфату міді;
- 1,0%-й розчин оцтової кислоти;
- 10,0 %-й розчин оцтової кислоти;
- насичений розчин хлориду натрія;
- пробірки;
- воронка для фільтрування;
- паперові фільтри;
- водяна баня.

Хід роботи:

Завдання 1. Осадження білків сульфатом амонію.

В пробірку відміряйте 2-3 см³ розчину яєчного білка, додайте рівний об'єм насиченого розчину сульфату амонію і суміш перемішайте.

Випадає осад глобулінів, альбуміни залишаються в розчині. Осад відфільтруйте на паперовому фільтрі.

До фільтрату додайте порошок сульфату амонію до отримання насиченого розчину (остання порція не розчиняється).

Випадає осад альбумінів, який також відфільтруйте.

Фільтр з осадом альбумінів промийте 5 см³ води, збираючи фільтрат в чисту пробірку.

Виконайте з фільтратом біуретову реакцію. Чи відбулося розчинення альбуміну?

Завдання 2. Осадження білків спиртом.

Органічні розчинники викликають осаження білків внаслідок руйнування гідратної оболонки макромолекул.

У пробірку налейте 1 см³ розчину яєчного білка з додаванням хлориду натрію. По краплях долийте 4-6 см³ спирту і сильно збовтайте. Через 5-8 хв. випадає осад білків.

Завдання 3. Осаження білків мінеральними кислотами. (незворотне осаження).

Реакція застосовується для швидкого визначення білка в біологічних рідинах, наприклад, сечі.

Дану роботу необхідно виконувати у витяжній шафі, дотримуючись особливої обережності!

У три пробірки налейте по 15-20 крапель концентрованих кислот: в першу - сірчаної; в другу - азотної і в третю - соляної.

Пробірки нахиліть під кутом 45° і **ОБЕРЕЖНО** (з піпетки) нашарувати по стінці розчин білка. Пробірку тримайте отвором від себе. На межі білка та кислоти з'являється біле кільце.

Пробірки обережно струсіть. Осади розчиняються в сірчаній та соляній кислотах, але не розчиняються в азотній кислоті.

Завдання 4. Осадження білків солями важких металів (незворотне осадження).

Білки осаджуються солями міді, свинцю, ртуті, цинку, срібла та інших важких металів. Властивість білків зв'язувати йони важких металів використовується в медицині при наданні першої допомоги постраждалим від отруєння солями міді, свинцю, ртуті.

У три пронумеровані пробірки налейте по 5-10 крапель розчину білка.

В першу пробірку по краплях додайте розчин ацетату свинцю. Утворюється осад. Додайте ще кілька крапель, осад повинен розчинитися в надлишку розчину солі.

У другу пробірку по краплях доливають розчин нітрату срібла. Осад, що утворився в надлишку солі розчиняється.

У третю пробірку додайте розчин сульфату міді до появи осаду. Переконайтеся, що осад розчиняється в надлишку солі.

Оформлення результатів:

Оформіть проведені дослідження у вигляді таблиці.

Осаджуючий реагент	Опис осаду	Розчинність осаду в надлишку реагента

Завдання 5. Теплова денатурація білка.

При нагріванні білки денатурують. На процес денатурації впливають рН розчину та додавання електролітів.

У п'ять пронумерованих пробірок налейте по 10 крапель розчину яєчного білка.

Білок в першій пробірці нагрійте до кипіння. Розчин мутніє (руйнуються гідратні оболонки навколо макромолекул), але осад не утворюється. Міцели,

утворені макромолекулами, зберігають однойменний заряд, що перешкоджає їх осадженню.

До розчину білка в другій пробірці додайте одну краплю 1,0% -го розчину оцтової кислоти і нагрійте до кипіння. Осад білка випадає швидко. Заряд мицелл нейтралізований і білок близький до ізоелектричної точки.

До розчину білка в третій пробірці додайте 1-2 краплі 10,0% -ого розчину оцтової кислоти і нагрійте до кипіння. Осад не утворюється, тому що міцели білка отримали, приєднуючи йони водню, позитивний заряд, що перешкоджає їх осадженню.

У четверту пробірку додайте 1-2 краплі 10,0% -го розчину гідроксиду натрію і нагривайте до кипіння. Осад не випадає. Міцели за рахунок відщеплення протонів від карбоксильних груп бічних ланцюгів білка заряджені негативно.

У п'яту пробірку додайте 1-2 крапель насиченого розчину хлориду натрію і нагривайте до кипіння. Білок випадає в осад.

Оформлення результатів:

Оформіть результати дослідження шляхом заповнення таблиці та і короткого описання механізму денатуруючої дії досліджуваного фактора у вигляді висновків.

№ пробірки	додаваний електроліт	ефект денатурації, що спостерігаємо	висновки

Лабораторна робота №3

ВИЛУЧЕННЯ КАЗЕЇНУ З МОЛОКА

Мета роботи - ознайомитися з методом виділення казеїну з молока, провести необхідні операції, обґрунтувати необхідність застосування казеїну в виробництвах комплексних харчових добавок.

Казеїн - найважливіший білок молока. Він відноситься до фосфопротейнів. Залишки фосфорної кислоти в молекулі казеїну пов'язані із залишками серину. При підкисленні до рН 4,7 (ізоелектрична точка казеїну) білок випадає в осад.

Додавання надлишку кислоти викликає перезарядку білкових молекул і перехід їх знову в розчин.

Реактиви та обладнання:

- молоко цільне знежирене;

- вода дистильована;
- 15,0 %-й розчин оцтової кислоти;
- 1,0 %-й розчин гідроксиду натрія;
- фарфорові чашки;
- стакани хімічні на 500 см³ та 1000 см³;
- ткани для фільтрування (бязь);
- індикатор – фенолфталеїновий папір;
- колба Бунзена;
- етанол 95,0%;
- ефір діетиловий.

Хід роботи:

300 мл цільного молока розбавляють 700 мл дистильованої води; до розчину додають 3 мл оцтової кислоти і слабо підігрівають. Розчин переливають у високу склянку і залишають на ніч. Жир, що сплив на поверхню, відокремлюють, а розчин відфільтровують від залишків жиру кілька разів через тканий фільтр (поки рідина не буде лише злегка каламутною). Отриману сироватку фільтрують через тканину, добре віджимають і промивають один або два рази водою. Промиту сироватку, що містить казеїн і жир, розтирають у фарфоровій чашці з невеликим об'ємом 1,0% -ного розчину їдкого натру. Густу кашку нейтралізують, добре перемішуючи, розчином їдкого натру тієї ж концентрації (індикатор - фенолфталеїновий папір). Фільтрат знову підкислюють оцтовою кислотою (від 3 до 5 мл); осад казеїну відціджують, промивають, ще раз розчиняють в лузі і осаджують оцтовою кислотою. Отриманий таким чином казеїн якомога сильніше віджимають, розтирають з невеликою кількістю спирту в пасту, віджимають вакуум-насосом, промивають спиртом і ефіром, сушать на повітрі або в ексікаторі над сірчаною кислотою. Сухий знежирений препарат казеїну - білий аморфний порошок. Вихід 6,0-8,0 г.

Лабораторна робота №4

ВИЗНАЧЕННЯ ІЗОЕЛЕКТРИЧНОЇ ТОЧКИ ЖЕЛАТИНУ

Мета роботи – визначення ізоелектричної точки желатину по каламутності його розчину.

Желатин - полідисперсна суміш поліпептидів (молекулярна маса-50-70 тис.), що утворюється з колагену.

В ізoeлектричній точці розчини білків нестійкі. Молекули білка з однаковою кількістю позитивних і негативних зарядів легко випадають в осад. Значення рН, відповідне ізoeлектричній точці, є характерним для кожного білка. Випадання білка в осад можна прискорити додаванням водовіднімаючих речовин, наприклад, етилового спирту.

Реактиви та обладнання:

- 1,0 %-й водний розчин желатину;
- 0,1 моль/дм³ розчин соляної кислоти;
- 0,1 моль/дм³ розчин їдкого натру;
- КФК-2 МП;
- мірні піпетки на 25,0 см³;
- колби на 100 та 500 см³;
- пробірки.

Хід роботи:

Піпеткою відібрати 25 см³ розчину желатину до вісьмох попередньо пронумерованих колб місткістю 100 см³. У ті ж колби внести зазначені в таблиці нижче об'єми 0,1 моль/дм³ розчину соляної кислоти або гідроксиду натрію для доведення розчинів до потрібного значення рН. Приготовлені таким чином розчини желатину мають значення рН = 3-11. Далі вимірюючи (за вказівкою викладача) каламутності отриманих розчинів визначити ізoeлектричні точки желатину.

№ колби	Об'єми розчинів, см ³		рН суміші
	0,1 моль/дм ³ НСІ	0,1 моль/дм ³ NaOH	
1	2,35	-	3,0
2	1,69	-	3,5
3	1,12	-	4,0
4	0,59	-	4,5
5	-	-	5,1
6	-	0,15	7,0
7	-	0,38	9,0
8	-	1,99	11,0

Примітка. Кількість введеної кислоти або розчину лугу може змінюватися в залежності від властивостей взятого для роботи желатину.

За допомогою фотоелектроколориметра КФК-2 МП виміряти каламутність приготованих розчинів желатину (коефіцієнти пропускання, τ). Дані внести в таблицю нижче.

Номер колби	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,1	7,0	9,0	11,0
коефіцієнт пропускання, τ								

Після закінчення вимірів побудувати криву залежності коефіцієнта пропускання від pH досліджувальних розчинів желатину та за мінімумом кривої визначити pH , що відповідає ізоелектричній точці желатину. Пояснити форму отриманої кривої.

РОЗДІЛ 2. ФЕРМЕНТИ

Ферменти (від латинського *fermentatio* - бродіння) можна визначити як білки, які завдяки своїй здатності до специфічного активування молекул речовин, мають каталітичні властивості. Будь-які порушення в функціонуванні ферментів в живій клітині можуть спричинити серйозні зміни в організмі.

Активація молекул субстрату в ході ферментативної реакції відбувається за рахунок утворення специфічного активованого комплексу фермент - субстрат, що супроводжується зміною енергії молекули субстрату та сприяє її переходу в продукт.

Вимірювання швидкості ферментативної реакції є найважливішим елементом методики дослідження ферментів. Кількість субстрату, що прореагувала за певний проміжок часу, може розглядатися як показник швидкості реакції (при певних умовах). При цьому вимірюють або концентрації субстратів, що витрачаються, або утвореного продукту.

При роботі з ферментами слід дотримуватися ряду вимог. Ферменти доволі нестійкі сполуки, тому не можна допускати їх інактивації. Загальними вимогами є постійність pH середовища, температури, співвідношення концентрацій ферменту та субстрату.

Серед параметрів, що характеризують властивості ферменту, і визначаються експериментальним шляхом слід виділити:

- структуру - амінокислотний склад, число пептидних ланцюгів, наявність коферментів і т.п.;

- властивості - природа реакції, що каталізується, субстратна специфічність, дія інгібіторів і активаторів;
- кінетичні характеристики - питома активність, дисоціація фермент-субстратного комплексу;
- термодинамічні властивості - константи рівноваги ферментативної реакції, величина вільної енергії, ентропії і ентальпії реакції, енергія активації комплексу фермент-субстрат, константа Міхаеліса;
- біологічні властивості - значення ферменту в обміні речовин, поширеність, внутрішньоклітинна локалізація, генетичні мутації.

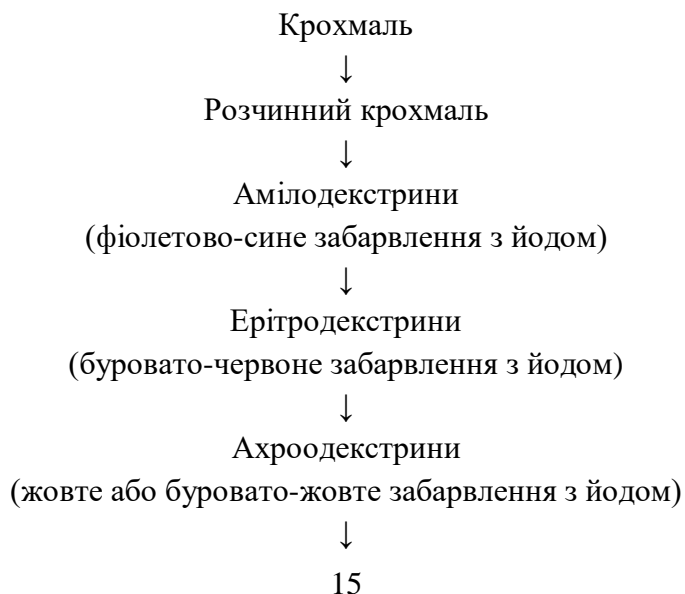
У харчових галузях ферменти використовуються як харчові добавки, які відносяться до групи допоміжних матеріалів - при виробництві пива, вина, соків, в хлібопекарстві, виробництві білкових гідролізатів і інвертного сиропу. Ферментні препарати дозволяють значно прискорювати технологічні процеси, збільшувати вихід готової продукції, підвищувати її якість, економити цінну сільськогосподарську сировину, покращувати умови праці на виробництві. В харчових технологіях застосовуються ферментні препарати з амілолітичною, протеолітичною, ліполітичною та оксидазною активністю.

Лабораторна робота №5

ФЕРМЕНТАТИВНИЙ ГІДРОЛІЗ КРОХМАЛЮ

Мета роботи - провести ферментативний гідроліз крохмалю з виявленням продуктів гідролізу.

Фермент амілаза, що міститься в слині, соку підшлункової залози, крові, печінки, мозку, каталізує гідроліз крохмалю. Послідовно процес розщеплення крохмалю можна представити таким чином:



Мальтодекстрини
(з йодом не дають забарвлення)



Мальтоза

Реактиви та обладнання:

- розчин слини (розводять дистильованою водою в 5 разів);
- 1,0 %-й розчин крохмалю;
- розчин йоду в йодиді калію (1 г КІ розчиняють в кількох см³ води. В отриманому концентрованому розчині солі розчиняють 1 г йоду та розводять водою до 300 см³);
- 5,0 %-й розчин гідроксиду натрія;
- 5,0 %-й розчин сульфата міді;
- пробірки;
- водяна баня.

Хід роботи:

Завдання 1. Гідроліз крохмалю.

У дві пробірки налейте по 2 см³ 1,0% -го розчину крохмалю.

В одну пробірку долейте 1 см³ розведеної слини, а в іншу - 1 см³ води (для контролю) і поставте пробірки на 10 хв. у водяну баню або термостат, нагріті до 37 - 38°C (уважно стежте за температурою, не допускаючи її підвищення).

Після закінчення реакції проаналізуйте вміст пробірок на вміст крохмалю і мальтози, як зазначено в завданнях 2 та 3.

Завдання 2. Виявлення продуктів гідролізу крохмалю.

З дослідної та контрольної пробірок (завдання 1) відлійте в окремі пробірки по 1 см³ розчинів.

Додайте в кожен пробірку по 1 краплі розчину йоду та перемішайте.

Порівняйте забарвлення отриманих розчинів.

Завдання 3. Виявлення мальтози.

До розчинів дослідної та контрольної пробірок, що залишилися, додайте по 1 краплі розчину сульфату міді і по 5 крапель розчину лугу.

Вміст пробірок перемішайте та помістіть їх в киплячу водяну баню.

Порівняйте забарвлення отриманих розчинів.

Оформлення результатів.

Запишіть схеми часткового і повного гідролізу крохмалю. Поясніть отримані результати завдань 2 і 3.

Лабораторна робота №6

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ ТА pH СЕРЕДОВИЩА НА АКТИВНІСТЬ α -АМІЛАЗИ

Мета роботи- вивчення деяких властивостей ферменту α -амілази.

Ферментативні перетворення крохмалю мають важливе значення для багатьох харчових технологій, в тому числі хлібопечення. Швидкість гідролізу під дією α -амілази залежить від стану крохмалю (нативний або клейстеризований крохмаль), від фракційного складу крохмальних гранул (відношення дрібних і великих зерен, вміст пошкоджених зерен), а також від ефективності ферменту. Характерна особливість усіх α -амілаз - наявність одного атома кальцію на молекулу ферменту. Роль кальцію полягає в тому, що він стабілізує вторинну і третинну структуру молекули α -амілази, забезпечуючи її каталітичну активність і оберігаючи її від дії протеолітичних ферментів і теплової денатурації.

Вплив температури і pH середовища на стабільність амілаз має велике практичне значення. Швидке руйнування зернової α -амілази при pH 3,3-4,0 є оптимальним технологічним фактором для випікання житнього хліба з борошна, яке містить надлишок α -амілаз при низьких значеннях pH, щоб запобігти зайвому руйнуванню структури крохмального зерна та утворенню клейких речовин в м'якиші хліба.

Реактиви та обладнання:

- солод;
- ферментний препарат α -амілази;
- 2,0% розчин крохмалю;
- вода дистильована;
- 1 М розчин оцтової кислоти;
- 1 М розчин оцтовокислого натрію;
- 1/15 М розчин Na_2HPO_4 ;
- 1/15 М розчин KH_2PO_4 ;
- 0,1 М розчин йоду;
- конічні колби на 100 см³;
- піпетка Мора на 20 см³;
- фільтри паперові;

- водяна баня;
- термометр;
- пробірки.

Хід роботи:

Метод визначення активності α -амілази заснований на якісній реакції продуктів гідролізу - декстринів - з розчином йоду.

В результаті гідролізу інтенсивне синє забарвлення крохмалю з йодом переходить в винно-червоне.

Виготовлення препаратів α -амілази.

Для приготування солодової витяжки до 4 г тонко подрібненого солоду додати 100 мл дистильованої води та екстрагувати протягом 1 години при 30°C. Потім суспензію відфільтрувати через складчастий фільтр, повертаючи назад на фільтр перші порції мутного фільтрату. Прозорий фільтрат використовують як джерело ферментів.

При використанні ферментного препарату взяти наважку 100 мг і розчинити в 100 мл дистильованої води.

Основна частина.

У колбу на 100 см³ внести піпеткою 20 см³ розчину крохмалю і 8 см³ буферних розчинів для створення певного значення рН. Кількість внесених буферів наведено в таблиці:

Розчини	Об'єми внесених буферів, см ³ при певному значенні рН				
	1	2	3	4	5
	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
CH ₃ COOH, 1 M	6,9	2,7	0,4	-	-
CH ₃ COONa, 1 M	1,1	5,3	7,6	-	-
Na ₂ HPO ₄ , 1/15 M	-	-	-	4,8	7,6
KH ₂ PO ₄ , 1/15 M	-	-	-	3,2	0,4

Суміш крохмалю з буфером помістити на водяну баню та нагрівати при температурі 30°C, 40°C, 50°C протягом 5 - 8 хвилин. Потім в колбу (не виймаючи з бані) додати 2 см² солодової витяжки або розчину ферменту. Перемішати. Записати час внесення ферменту (початок гідролізу).

Через 10, 20, 30, 45 хвилин відібрати по 1 см³ гідролізної суміші, внести її в пробірку з 5 см³ йодного розчину, струсити. Коли проба гідролізату дає винно-червоне забарвлення з йодним розчином, гідроліз закінчений.

Декстринуючу активність (А, од/г) визначають за формулою:

$$A = \frac{0,4 \cdot 60}{t \cdot v \cdot q},$$

де 0,4 – наважка крохмалю в 20 см³ розчину,

60 – переведення хвилин в години;

V – об'єм розчину ферменту або екстракту, що взятий для гідролізу, см³;

τ – час декстринізації, хв.;

q - вміст ферменту або солоду в 1 см³ екстракту або розчину, г

Приклад розрахунку. В якості джерела фермента α-амілази був використан солод. Для екстракції взято наважку 4 г та додано 100 см³ дистильованої води, що відповідає вмісту солода в 1 см³ екстракту 0,04 г. Об'єм екстракту для гідролізу крохмалю склав 2 см³. Час закінчення гідролізу – 20 хв. Отже декстринуюча активність солода дорівнює:

$$A = \frac{0,4 \cdot 60}{20 \cdot 2 \cdot 0,04} = 15 \text{ од/г}$$

Оформлення результатів роботи.

Отримані результати вносять в таблицю:

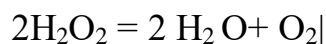
Температура гідролізу, °С	Час декстринізації, хв	Вміст солода або ферменту в 1 см ³ розчину, г	Декстринуюча активність солода, од/г
30			
40			
50			

Лабораторна робота №7

ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ В КАРТОПЛІ

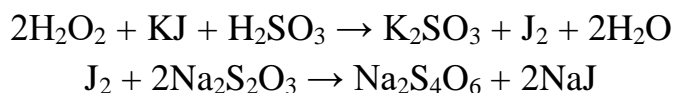
Мета роботи – опанувати методи визначення активності каталази в рослинній сировині.

Каталаза - фермент, субстратом якого є перекис водню



Каталаза представляє собою складний білок, небелковою частиною якого є гем. Каталаза володіє високою каталітичною здатністю. Одна її молекула при 28 °С за 1 хв каталізує розщеплення 1600000 молекул H_2O_2 .

В основі визначення активності каталази є розрахунок вмісту в реакційній суміші непрореагованого перекису водню. Перекис водню визначається по реакції з йодидом калію та подальшим вимірюванням кількості вільного йоду, що утворився:



Реактиви та обладнання:

- картопля;
- 0,1N розчин перекису водню;
- фосфатний буфер (рН 6,8);
- 2N розчин сірчаної кислоти;
- 5,0 % розчин йодиду калію;
- 1,0 % розчин крохмалю;
- 0,01 М розчин тіосульфату натрію;
- дистильована вода;
- колби на 50 см³;
- мірні циліндри;
- воронки;
- марлевий фільтр.

Хід роботи:

20 г подрібненої картоплі поміщають в колбу на 50 см³, доводять об'єм до мітки дистильованою водою та залишають при кімнатній температурі на 1 годину. Після цього вміст колби фільтрують крізь марлю. Фільтрат використовують в роботі в якості досліджуваного зразка, що містить каталазу.

В колбу 1 (контрольний зразок) та колбу 2 (досліджувальний зразок), вносять по 10 см³ 0,1N розчину H_2O_2 у фосфатному буфері (рН 6,8). В колбу 1 додають 5 см³ 2N H_2SO_4 , далі в обидві колби - по 5 см³ досліджуваного зразку. Вміст колби ретельно перемішують.

Через 10 хвилин в колбу 2 додають 5 см³ 2 N H_2SO_4 , а далі в обидві колби - по 5 см³ 5,0 % розчину KI та по 10 крапель 1,0 % розчину крохмалю, ретельно перемішують та титрують розчином $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Активність каталази (А) в картоплі визначають за формулою:

$$A = (V_1 - V_2) \cdot C(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \cdot M(\text{H}_2\text{O}_2) \cdot f_{\text{ЭКВ}}(\text{H}_2\text{O}_2)$$

де: V_1 - кількість 0,01 М розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, що витрачена на титрування контрольного зразка, см^3 ;

V_2 - кількість 0,01 М розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ що витрачена на титрування досліджувального зразку, см^3 ;

$M(\text{H}_2\text{O}_2)$ - молярна маса перекису водню, г/моль:

$f_{\text{ЭКВ}}(\text{H}_2\text{O}_2) = 1/2 C(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$ - концентрація розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, М.

РОЗДІЛ 3. НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ

Нуклеїнові кислоти - найважливіші біополімери з відносною молекулярною масою, що досягає $5 \cdot 10^9$ а. о. м. Вони містяться у всіх без винятку живих організмах і є не тільки джерелом генетичної інформації, а й виконують ряд інших життєво важливих функцій. Нуклеїнові кислоти є полімерами, мономерними ланками яких є нуклеотиди.

Існує два різних типи нуклеїнових кислот - дезоксирибонуклеїнові кислоти (ДНК) та рибонуклеїнові кислоти (РНК). ДНК являє собою генетичний матеріал більшості організмів. У клітинах прокаріотів, крім основної хромосомної ДНК, часто зустрічаються позакромосомні ДНК - плазміди. У клітині основна маса ДНК міститься в клітинному ядрі, де вона пов'язана з білками в хромосомах. Клітини еукаріот містять ДНК також в мітохондріях і хлоропластах.

Молекули ДНК - найбільші біологічні молекули. Молекула ДНК *E.coli* складається приблизно з 4000000 пар нуклеотидів, її відносна маса дорівнює 26000000000, а довжина - 1,4 мм, що в 700 разів перевищує розміри її клітини. Молекули ДНК еукаріот можуть досягати ще більших розмірів, їх довжина може становити кілька сантиметрів, а відносна маса 10¹⁰-10¹¹. Щоб записати нуклеотидну послідовність ДНК людини, буде потрібно близько 1000000 сторінок.

Що ж стосується РНК, то за функціями, які вони виконують розрізняють:

а) інформаційні РНК (іРНК) - в них записана інформація про первинну структуру білка;

б) рибосомні РНК (рРНК) - входять до складу рибосом;

в) транспортні РНК (тРНК) - забезпечують доставку амінокислот до місця синтезу білка.

У якості генетичного матеріалу РНК входять до складу ряду вірусів. Наприклад, віруси, що викликають такі небезпечні захворювання, як грип і СНІД, є РНК-вмісними.

Нуклеїновим кислотам притаманні три найважливіші функції: зберігання, передача та реалізація генетичної інформації.

Щодо застосування нуклеїнових кислот у харчовій промисловості, то їх використання у якості підсилювачів смаку та аромату з технологічної точки зору виправдане. Адже вони досить стійкі в звичайних умовах виробництва і зберігання. Нуклеотиди руйнуються лише при нагріванні в присутності фосфатаз, особливо при високій вологості продукту. Тому додавати нуклеотиди в продукти з сильною фосфатазною активністю (пшеничне борошно, незнежирене соєве борошно, гриби) слід після їх теплової обробки. Зазвичай використовують синергетичні суміші, наприклад, гуанілати з інозіатами або з глютаматами для покращення органолептичних показників продукції та отримання більш гармонійного смаку.

Лабораторная работа №8

ВИДІЛЕННЯ НУКЛЕОПРОТЕЇДІВ З ДРІЖДЖІВ

Мета роботи – опанувати методику виділення нуклеопротеїдів з дріжджів для проведення подальшого гідролізу отриманого осаду.

Реактиви та обладнання:

- дріжджі пресовані;
- 0,4 % розчин їдкого натру;
- діетиловий ефір;
- 5,0 % розчин оцтової кислоти;
- дистильована вода;
- скляні палички;
- ступка фарфорова;
- пестик;
- пісок скляний;
- мірні циліндри;
- піпетки;
- ваги електронні;
- центрифуга.

Хід роботи:

У фарфорову ступку вносять 1,0 г дріжджів, додають 1 краплю диетилового ефіру, 2 краплі дистильованої води та 0,1 г скляного піску. Дріжджову масу розтирають пестиком 1-2 хв. для руйнування дріжджових клітин.

В ступку додають 4 см³ 0,4 % розчину їдкого натру та продовжують розтирання протягом 5 хв. Вміст ступки обережно переносять до центрифужної пробірки та центрифугують протягом 10 хв.

Надосадову рідину переносять до чистої центрифужної пробірки та додають при перемішуванні 1,5 см³ 5,0 % розчину оцтової кислоти. Утворюється осад нуклеопротеїдів. Пробірку з осадом знову центрифугують 10 хв. Надосадову рідину зливають а отриманий осад нуклеопротеїдів використовують у наступній роботі.

Оформлення результатів

В лабораторному журналі описати хід роботи та свої спостереження.

Лабораторна робота №9

ГІДРОЛІЗ НУКЛЕОПРОТЕЇДІВ

Мета роботи – провести гідроліз нуклеопротеїдів та дослідними реакціями виявити компоненти, що входять до складу нуклеопротеїдів.

Для вивчення хімічного складу нуклеопротеїдів зручно користуватись дріжджовими клітинами. При нетривалому гідролізі вилучених з дріжджової маси нуклеопротеїдів останні розпадаються на поліпептиди, пуринові та піримідинові основи, рибозу та дезоксирибозу, фосфорну кислоту. Продукти гідролізу можуть бути виявлені в гідролізаті специфічними для кожної сполуки реакціями.

Реактиви та обладнання:

- осад нуклеопротеїдів, отриманий в попередній роботі;
- 10,0 % розчин сірчаної кислоти;
- 30,0 % розчин їдкого натру;
- 10,0 % розчин їдкого натру;
- 25,0 % розчин аміаку;
- 1,0 % розчин сульфату міді;
- 7,0 % розчин сульфату міді;
- 1,0 % розчин нітрату срібла;
- молібденовий реактив (3,75 г молібдату амонію розчиняють в 50 см³ дистильованої води та додають 50 см³ 32,0 % розчину азотної кислоти (густина 1,2 г/см³), повне розчинення молібдату амонію протікає при додаванні кислоти);
- круглодонна колба із зворотнім холодильником;
- мірні циліндри;
- воронка для фільтрування;

- ваги електронні;
- паперові фільтри.

Хід роботи:

Осад нуклеопротейдів, отриманий в попередній роботі, розчиніть в 4,0 см³ 10,0% розчину сірчаної кислоти і перенесіть в круглодонну колбу.

Колбу закрийте пробкою зі зворотним холодильником. Реакційну суміш нагрійте на електричній плитці до кипіння і кип'ятіть протягом 1,5 год.

Суміш остудіть і профільтруйте через паперовий фільтр. З фільтратом виконайте реакції нижченаведених завдань для виявлення продуктів гідролізу нуклеопротейдів.

Завдання 1. Виявлення поліпептидів (біуретова проба).

До 5 крапель гідролізату додати 10 крапель 10,0 % розчину їдкого натру та 1 краплю 1,0 % розчину сульфату міді. Утворюється рожеве забарвлення рідини.

Завдання 2. Виявлення пуринових основ (срібна проба).

10 крапель гідролізату нейтралізувати 1 краплею розчину аміаку та додати 5 крапель 1,0 % розчину нітрату срібла. Через 5 хв витримки випадає рихлий осад бурого кольору (срібні сполуки пуринових основ - аденіну та гуаніну).

Завдання 3. Виявлення пентоз (рибози та дезоксирибози). Проба Тромера.

До 5 крапель гідролізату додають 10 крапель 30,0 % розчину їдкого натру та 1-3 краплі 7,0 % розчину сульфату міді до появи незникаючої муті гідроокису міді. Рідину перемішують та верхній шар нагрівають до початку кипіння.

Випадає червоний осад закису міді (або жовтий осад гідрату закису міді) внаслідок окиснення рибози та відновлення гідрату окису міді до закису.

Задание 4. Виявлення фосфорної кислоти (молібденова проба)..

До 20 крапель молібденового реактиву додають 3 краплі гідролізату та кип'ятять на вогні кілька хвилин. У присутності фосфорної кислоти рідина забарвлюється у лимонно-жовтий колір. При охолодженні випадає жовтий кристалічний осад комплексної сполуки - молібденовокислого амонію, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3$.

Оформлення результатів

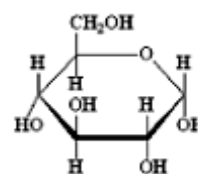
В лабораторному журналі описати хід роботи та свої спостереження.

РОЗДІЛ 4. ВУГЛЕВОДИ

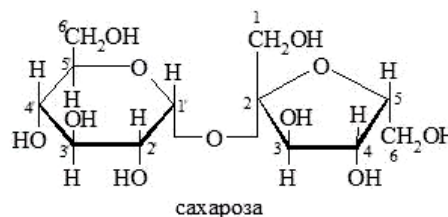
Вуглеводи – це органічні речовини, що належать до класу полігідроксикарбонільних сполук. Багато вуглеводів має склад, що відповідає загальній формулі $C_n(H_2O)_m$, але відомі також вуглеводи іншого складу. Разом з тим, цією формулою можна описати склад деяких органічних сполук, які не належать до вуглеводів (оцтова кислота $C_2H_4O_2$, формальдегід CH_2O).

Класифікація. Вуглеводи поділяють на три групи: моносахариди (не гідролізуються), дисахариди (утворюють під час гідролізу дві молекули моносахаридів) та полісахариди – високомолекулярні речовини (утворюють під час гідролізу n молекул моносахаридів). Серед моносахаридів є альдози, що мають альдегідну групу, та кетози, які містять кетонну групу. Залежно від числа атомів кисню в молекулі розрізняють тріози, тетрози, пентози, гексози тощо.

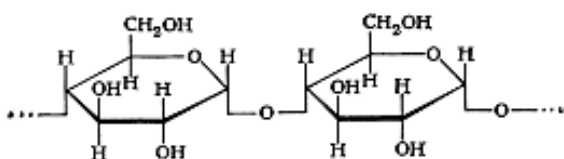
Прості вуглеводи (моносахариди, або монози) є полігідроксикарбонільними сполуками, не здатними при гідролізі утворювати більш прості вуглеводні молекули (наприклад, глюкоза).



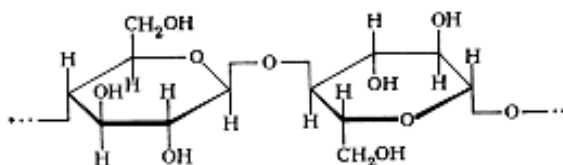
До відомих дисахаридів ($C_{12}H_{22}O_{11}$) відносяться сахароза (буяковий цукор), мальтоза, лактоза (молочний цукор).



Складні вуглеводи (полісахариди, або поліози) представляють собою полімери, побудовані із залишків моносахаридів. Вони при гідролізі утворюють прості вуглеводи. Залежно від ступеня полімеризації їх підрозділяють на низькомолекулярні (олігосахариди, ступінь полімеризації яких, як правило, менше 10) і високомолекулярні.



фрагмент молекули крохмалю



фрагмент молекули целюлози

Вуглеводи утворюються в зелених рослинах у результаті фотосинтезу з оксиду вуглецю (IV) та води. їх масова частка становить близько 80 % сухої маси речовини рослин і до 2 % – тваринних організмів.

Вуглеводи відіграють важливу роль у житті людини. Як і жири, вони є джерелом енергії в організмі. Їжа людини приблизно на 70 % складається з вуглеводів. Вуглеводи є сировиною для виготовлення паперу, тканин.

У природі найбільш поширені правообертаючі глюкоза, галактоза, маноза, сахароза, лівообертаюча фруктоза.

Глюкоза міститься майже в усіх органах рослин – плодах, корінні, листі, квітках. Багато її є у винограді, цукровій тростині, цукрових буряках, солодких фруктах, ягодах. Глюкоза входить до складу тваринних організмів. Її масова частка у крові людини становить близько 0,1 %. Глюкозу використовують в медицині, для виготовлення кондитерських виробів, дзеркал та іграшок (сріблення), обробки тканин і шкір.

Крохмаль – найпоширеніший у рослинному світі вуглевод. Він утворюється в листі в результаті фотосинтезу і відкладається в корінні, бульбах і зернах. Масова частка крохмалю в бульбах картоплі становить близько 20 %, у зернах пшениці та кукурудзи – 70, рису – близько 80 %. Крохмаль застосовується у виробництві антибіотиків, вітамінів, ковбас, кондитерських виробів, у медицині, для крохмалення білизни, обробки тканин. Багато його переробляють на етиловий спирт, глюкозу, декстрини та інші речовини.

Целюлоза є головною складовою частиною оболонки клітин вищих рослин. Її масова частка в деревині становить близько 50 %, у волокнах бавовни – до 98, у корі джута – до 75 %. Гігроскопічна вата та фільтрувальний папір – майже чиста целюлоза. Целюлозу в складі деревини використовують як будівельний матеріал і для виготовлення різних столярних виробів, у складі волокнистих матеріалів (бавовни, льону, конопель) – для виготовлення ниток, тканин, канатів. Багато целюлози переробляють на папір, етиловий спирт, вату, прості та складні ефіри, які є сировиною для виробництва штучних волокон (віскозних, ацетатних), штучної шкіри, пластичних мас (целулоїду, целофану), лаків, електроізоляційних покриттів.

Лабораторна робота № 10

ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ВУГЛЕВОДИ

Мета роботи – опанувати навиками проведення якісних реакцій на вуглеводи та описати явища, що спостерігаються.

Реактиви та обладнання:

- 25,0 % розчин аміаку;
- 1,0 % розчин лактози;
- 1,0 % розчин мальтози;
- 1,0 % розчин глюкози;
- 1,0 % розчин крохмалю;

- 20,0 % розчин їдкого натру;
- 5,0 % розчин сульфату міді;
- 1,0 % розчин йоду;
- штатив;
- пробірки;
- газові горелки;
- пипетки на 1,0 см³, 0,5 см³.

Хід роботи:

Завдання 1. Виявлення лактози та мальтози.

Лактоза і мальтоза з аміаком в лужному середовищі утворюють забарвлену сполуку.

У дві пробірки, що містять по 5,0 см³ лактози і мальтози, додають по 2,5 см³ розчину аміаку, 0,3 см³ 20,0 % розчину їдкого натру і нагрівають на водяній бані до появи червоно-коричневого кольору.

Завдання 2. Виявлення відновлюючих сахаридів реакцією Троммера.

Моносахариди та деякі дисахариди, в молекулах яких є карбонільна група, в лужному середовищі відновлюють оксид міді (II) в оксид міді (I).

В 4 пронумеровані пробірки внести по 10 крапель одного з вуглеводів: глюкози, мальтози, сахарози і крохмалю. Додати по 10 крапель розчину їдкого натру і по 2 краплі розчину сульфату міді, нагрівають до кипіння. У пробірках з мальтозою і глюкозою випадає осад оксиду міді (I) цегляно-червоного кольору.

Завдання 3. Обнаружение крахмала.

Крохмаль з розчином йоду утворює забарвлене з'єднання синього кольору.

До 10 крапель розчину крохмалю додати 1-2 краплі розчину йоду. Спостерігається яскраво-синє забарвлення. Пробірку з отриманим розчином можна нагріти над газовою горелкою протягом 10 сек, розчин стане безбарвним. Це пояснюється тим, що сполучення йоду та крохмалю є нестійким, але якщо потримати пробірку в холодній воді, то знову буде утворюватися осад темно-синього кольору. При нагріванні крохмалю до кип'ятіння він починає руйнуватися, і ланцюги амілози будуть рватися. Так утворюються короткі ланцюжки декстринів, тому колір починає змінюватися.

Лабораторна робота №11

ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ВУГЛЕВОДІВ. ЗАГАЛЬНІ ТА СПЕЦИФІЧНІ.

Мета роботи - опанувати методи проведення реакцій на вуглеводи.

Реактиви та обладнання:

- 3,0 % та 0,5 % розчин глюкози (декстрази) та суха речовина;
- 3,0 % розчин фруктози та суха речовина (або 5,0 % розчин меду, основним компонентом меду є фруктоза);
- сахароза;
- реактив Селиванова (0,05 г резорцина розчиняють в 100 см³ 20,0 % соляної кислоти);
- 10,0 % спиртовий розчин α -нафтолу;
- сірчана кислота конц.;
- соляна кислота конц.;
- 5,0 % спиртовий розчин тимолу;
- реактив Фелінгу (см. приготування нижче);
- 5,0 % розчин нітрату срібла (зберігають в темному місці);
- 10,0 % розчин аміаку;
- анілін;
- розчин соляної кислоти (1:1);
- 10,0 % розчин гідроксиду натрію;
- 2,0 % розчин сульфату міді (II);
- спирт етиловий;
- дистильована вода;
- пробірки;
- крапельниці;
- водяна баня;
- газові горілки.

Хід роботи:

Завдання 1. Реакція Моліша.

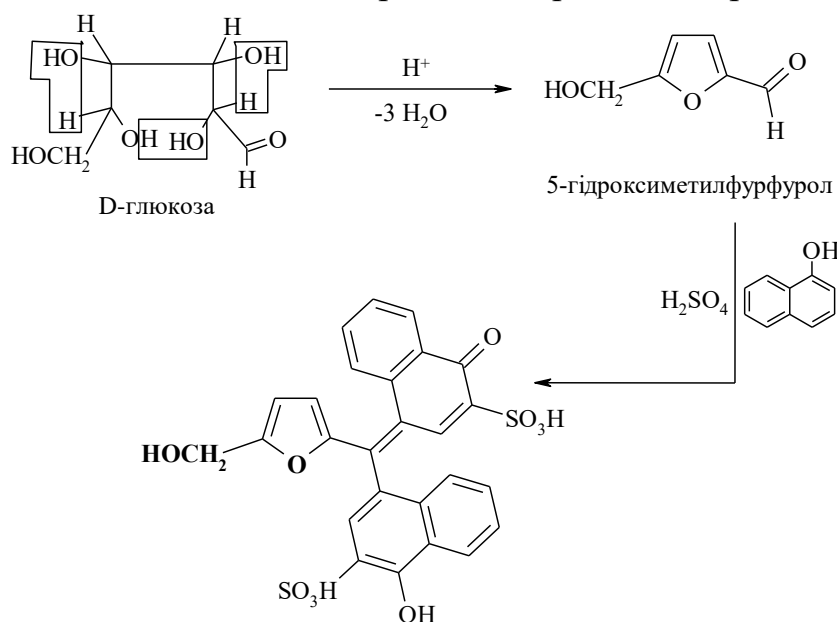
До 1 см³ водного розчину або суспензії досліджуваної сполуки (беруть кілька кристалів вуглеводу) додають 1–2 краплини 10,0% спиртового розчину α -нафтолу.

Пробірку струшують, далі нахиляють і по стінці пробірки до суміші обережно приливають 1 см³ концентрованої сірчаної кислоти таким чином, щоб кислота не змішувалась з водним шаром (важкий шар кислоти має опуститися на дно пробірки). Виникнення **темно-фіолетового** кільця на межі двох шарів вказує на наявність вуглеводу або сполуки, яка містить вуглевод.

Поява забарвлення обумовлена утворенням продукту конденсації 5-гідроксиметилфурфуролу з α -нафтолом.

Реакції перешкоджає азотиста кислота, нітрат- та нітрит-іони.

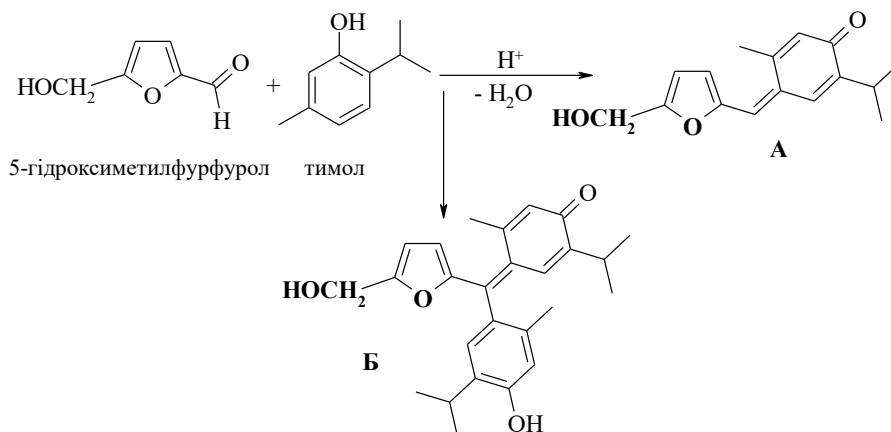
Цю реакцію дають всі вуглеводи та вуглеводмісні сполуки, особливо чутливі - кетози. Вона спостерігається при концентрації альдоз $\geq 0.01\%$:



Завдання 2. Реакція з тимолом

Декілька кристаликів цукру нагрівають з 10 см^3 концентрованої соляної кислоти та додають 5,0% спиртовий розчин тимолу. З'являється **червоне** забарвлення.

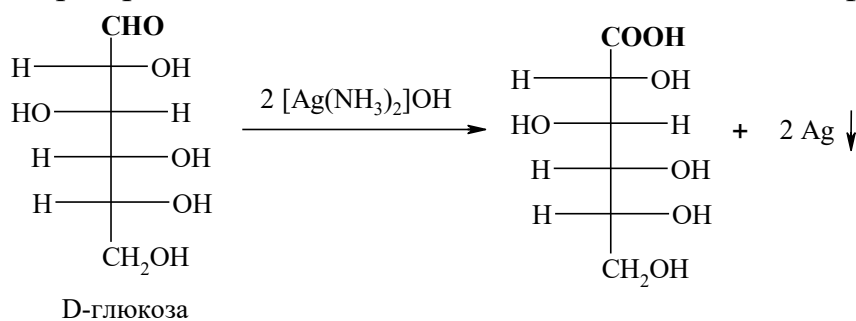
В результаті взаємодії гексоз з хлороводневою кислотою утворюється 5-гідроксиметилфурфурол, який конденсуючись з тимолом дає забарвлені продукти (**А** або **Б**, в залежності від співвідношення реагентів та умов реакції):



Завдання 3. Реакція срібного дзеркала.

В пробірку з 5 см^3 аміачного розчину оксиду срібла (в пробірку додати 5 см^3 розчину нітрату срібла і додати по краплях розчин аміаку; спочатку утворюється сірий осад, який розчиняється в надлишку аміаку) додають декілька кристаликів досліджуваної сполуки, суміш обережно нагрівають на водяній бані при $60 - 70^\circ\text{C}$ впродовж 2-3 хв.

Відновлюючі вуглеводи виявляють за утворенням **срібного дзеркала** на стінках пробірки. Окисненню піддіється лише ланцюгова форма вуглеводу:



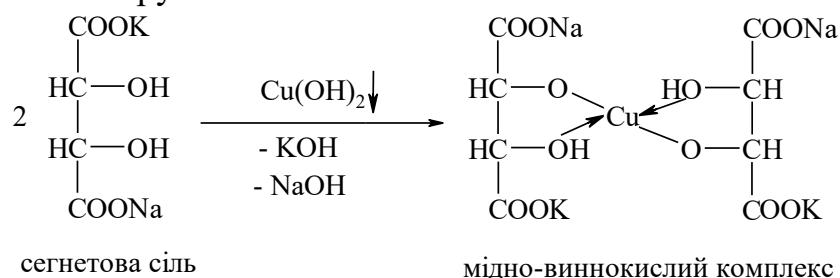
Цю реакцію дають всі альдегіди та деякі інші споріднені сполуки (наприклад, похідні альдегідів - альдіміни).

Завдання 4. Реакція Фелінга.

Для цієї реакції готують реактив Фелінга, який складається з двох розчинів, які зберігаються окремо.

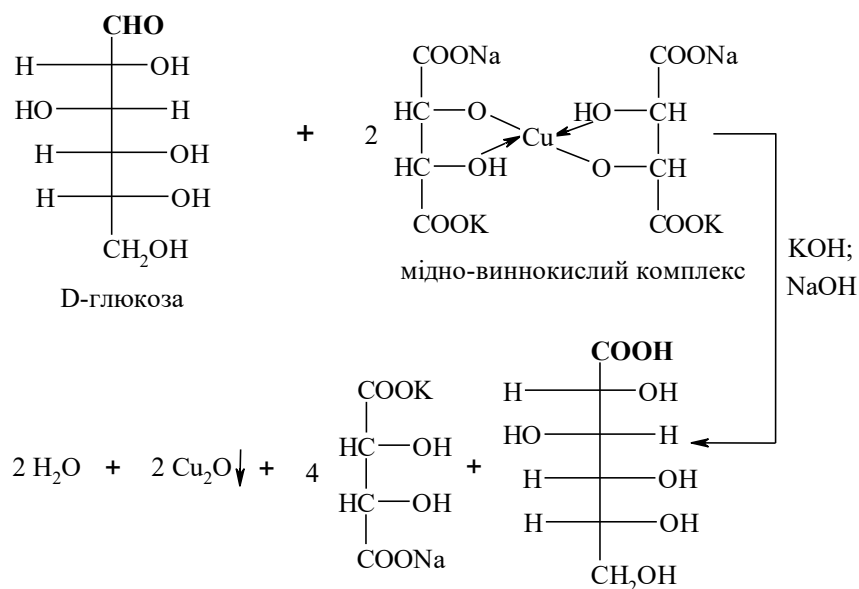
Перший розчин містить 34 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 500 мл води, другий розчин – 173 г сегнетової солі та 75 мл гідроксиду натрію в 500 мл води.

При змішуванні обох розчинів спостерігається виділення блакитного осаду гідроксиду міді (II), який із сегнетовою сіллю утворює водорозчинний комплекс синього кольору:



Для аналізу декілька міліграмів досліджуваної сполуки (наприклад, ≈ 3 краплини 3,0% розчину глюкози) розчиняють в суміші рівних об'ємів обох розчинів (при нагріванні реакція відбувається швидше).

Якщо сполука є **відновлюючим вуглеводом**, розчин швидко бліднішає і утворюється **червоний** (червоно-коричневий) **осад** оксиду міді (I).



Для багатьох вуглеводів (дисахариди, полісахариди) необхідно прокип'ятити суміш на водяній бані.

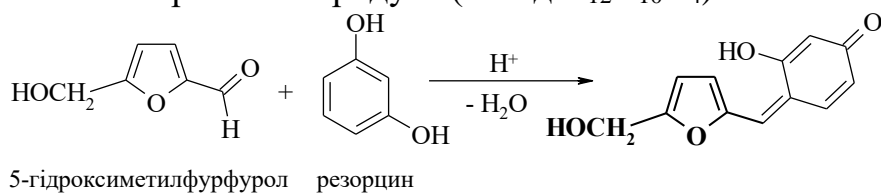
Слід пам'ятати, що реакцію Фелінга можуть давати *не лише вуглеводи*, а й інші сполуки, наприклад, аліфатичні альдегіди.

Завдання 5. Реакція Селіванова на кетози.

До водного розчину досліджуваного вуглеводу додають рівний об'єм концентрованої соляної кислоти, декілька краплин 0,5 % розчину резорцину в 20,0% соляній кислоті, суміш нагрівають до кипіння. Після витримання впродовж 15–30 хв при 80–90 °С **кетози** дають **червоне** забарвлення, а потім **темний осад** (при подальшому кип'ятінні розчину). Відфільтрований осад розчиняють в спирті з утворенням червоного розчину.

При тривалому кип'ятінні **альдози** також дають **червоне** (блідорозове) забарвлення, але менш інтенсивне, ніж кетози. **Осад при цьому не утворюється.**

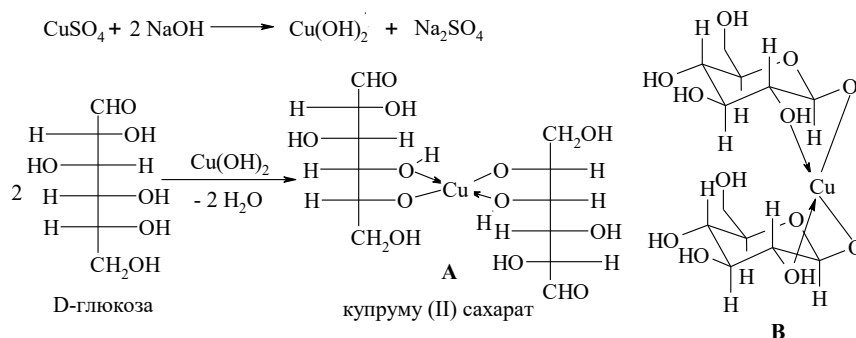
У процесі реакції при нагріванні гексоз з хлороводневою кислотою утворюється 5-гідроксиметилфурфурол, який конденсується з резорцином утворюючи забарвлений продукт (склад $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_4$):



Реакція Селіванова дозволяє виявити в суміші цукрів *кетогексози* як у *вільному*, так і в *зв'язаному* стані (дисахариди).

Завдання 6. Доведення наявності α -глікольного фрагменту в глюкозі.

У пробірку вміщують 6 крапель 10,0 % розчину гідроксиду натрію, 1 краплю 2,0 % розчину сульфату міді (II). Спостерігають утворення *синього осаду* гідроксиду міді (II). При додаванні 1 краплі 0,5% розчину D-глюкози *осад швидко розчиняється* з утворенням *прозорого синього розчину*:



Для спрощення сприйняття будови комплексу, його часто зображують з відкритим ланцюгом вуглеводу (**А**), але треба враховувати, що вуглеводи існують в розчинах переважно у циклічній формі і реальна будова комплексу має відповідати структурі **В**.

Ця реакція підтверджує наявність α -глікольного фрагмента в молекулі D-глюкози.

Отриманий розчин зберігають для виконання наступного досліду.

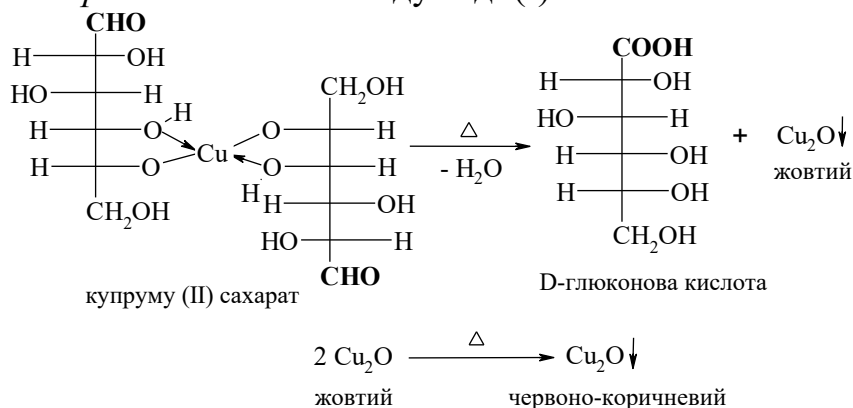
Завдання 7. Проба Троммера (виявлення відновлюючих цукрів).

Відновлення гідроксиду міді (II) глюкозою в лужному розчині.

До отриманого в попередньому досліді прозорого розчину купрум (II) сахарату *синього* кольору додають кілька крапель води так, щоб висота рідини в пробірці була ~ 20 мм.

Пробірку тримають похило і обережно нагрівають у полум'ї горелки верхню частину розчину. Спостерігається перехід *синього* забарвлення розчину в *зелене*, а потім його *знебарвлення*.

Одночасно з'являється *жовтий осад* оксиду міді (I) (у розчині може існувати гідратована форма $\text{Cu}_2\text{O} \cdot x\text{H}_2\text{O}$), що агрегуючись перетворюється в *червоно-коричневий осад* оксиду міді (I):



Оформлення результатів

Оформіть проведені досліди у вигляді таблиці.

№ завдання	Досліджу вальна сполука	Реагент	Умови проведення реакції	Що спостерігається	Висновки

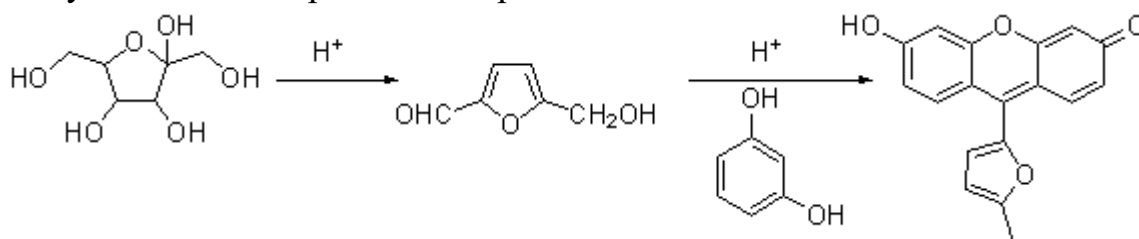
--	--	--	--	--	--

Лабораторна робота №12

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ФРУКТОЗИ

Мета роботи - ознайомитись з фотометричним методом визначення фруктози в біоматеріалі.

Визначення фруктози засновано на реакції Селіванова: при нагріванні фруктози або інших кетоз з соляною кислотою утворюється оксиметилфурфу-рол. Оксиметилфурфурол з резорцином утворюють сполуку (продукт конденсації), забарвлену в вишнево-червоний колір:



Швидкість утворення оксиметилфурфурола в реакції фруктози з соляною кислотою при нагріванні у багато разів більше, ніж для альдогексоз, що обумовлює специфічність реакції Селіванова для фруктози. Альдози в цих же умовах взаємодіють повільніше і дають блідо-рожеве забарвлення або взагалі не взаємодіють.

Величину екстинкції розчину, що містить продукт конденсації утвореного із фруктози оксиметилфурфурола з резорцином, визначають фотометрично. Для кількісного визначення вмісту фруктози готують стандартний розчин фруктози (контроль).

Екстинкція - ослабіння пучка світла при його поширенні в речовині за рахунок спільної дії поглинання світла і розсіювання світла.

Реактиви та обладнання:

- досліджувальний розчин фруктози (10–100 мг/мл);
- стандартний розчин фруктози (25 мг/мл);
- 0,1 % розчин резорцину в 96,0 % етиловому спирті;
- 30,0 % розчин соляної кислоти;
- скляні палички;
- пробірки с пришлифованим воздушним зворотним холодильником;
- пипетки;
- штатив для пробірок;

- водяна баня;
- годинник;
- термометр лабораторний;
- спектрофотометр.

Хід роботи:

В одну пробірку з пришліфованим зворотним холодильником вносять 2 см³ досліджуваного розчину фруктози (проба), в другу - 2 см³ стандартного розчину фруктози (контроль). Потім в обидві пробірки додають по 2 см³ розчину резорцину і по 6 см³ розчину соляної кислоти. Зміст пробірок перемішують і нагрівають на водяній бані протягом 8 хв при t 80 °С. Після нагрівання розчини охолоджують і колориметрують при 490 нм.

Екстинкцію вимірюють, використовуючи реактиви, замінюючи 2 см³ розчину фруктози 2 см³ дистильованої води.

Масову концентрацію фруктози досліджувальній пробі (мкг/мл) розраховують за формулою:

$$C = Q \cdot E_1 / E_2,$$

де E_1 та E_2 – екстинкція досліджуваного і стандартного розчинів відповідно;

Q – коефіцієнт, що являє собою відношення масової концентрації в стандартній пробі до об'єму проби.

Цим методом можна визначити також масову концентрацію фосфорних ефірів фруктози - фруктозо-1,6-дифосфата і фруктозо-6-фосфата (продукти ензиматичного окиснення глюкози). Хід роботи такий же, як для фруктози, але для розрахунку концентрації фруктозо-1,6-дифосфата знайдене значення для фруктози потрібно помножити на 3,6, а для фруктозо-6-фосфата - на 2,39. Ці поправки вводяться з урахуванням того, що у фруктозо-1,6-дифосфаті та у фруктозо-6-фосфаті фруктоза становить 53,0 % і 60,5 % відповідно, а інтенсивність її колірної реакції - 52,3 % і 69,2 %.

Оформлення роботи.

Привести розрахунки з приготування реактивів. Провести кількісне визначення фруктози, привести відповідні розрахунки.

РОЗДІЛ 5 ЛІПІДИ

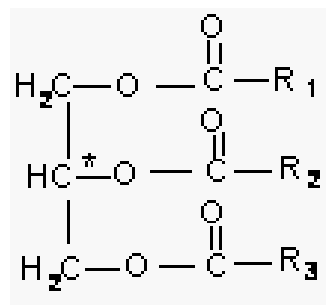
Ліпіди представляють собою неоднорідну групу хімічних сполук, нерозчинних у воді, але добре розчинних в неполярних органічних розчинниках: хлороформі, ефірі, ацетоні, бензолі і ін., Тобто загальною їх властивістю є гідрофобність. Через велике розмаїття ліпідів дати більш точне визначення їм неможливо.

Поділяють ліпіди на *прості* (містять лише залишки жирних кислот, спиртів (альдегідів) і *складні* (містять залишки також фосфорної, фосфонової кислот, моно- і олігосахаридів). Ліпіди в більшості випадків є складними ефірами жирних кислот і будь-якого спирту.

Виділяють наступні класи ліпідів: тріацілгліцеріни, або жири, фосфоліпіди, гліколіпіди, стероїди, воски, терпени.

Розрізняють дві категорії ліпідів - обмилювані та необмилювані. До обмилюваних відносяться речовини, що містять складноефірний зв'язок (воски, тріацілгліцеріни, фосфоліпіди та ін.). До необмилюваних відносяться стероїди, терпени.

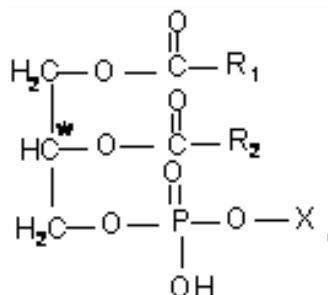
Тріацілгліцеріни є складними ефірами трехатомного спирту гліцерину:



Фосфоліпіди містять гідрофобну і гідрофільну області і тому мають амфіфільні властивості, тобто здатні розчинятися в неполярних розчинниках та утворювати стійкі емульсії з водою.

Фосфоліпіди в залежності від наявності в їх складі спиртів гліцерину та сфінгозину діляться на гліцерофосфоліпіди і сфінгофосфоліпіди.

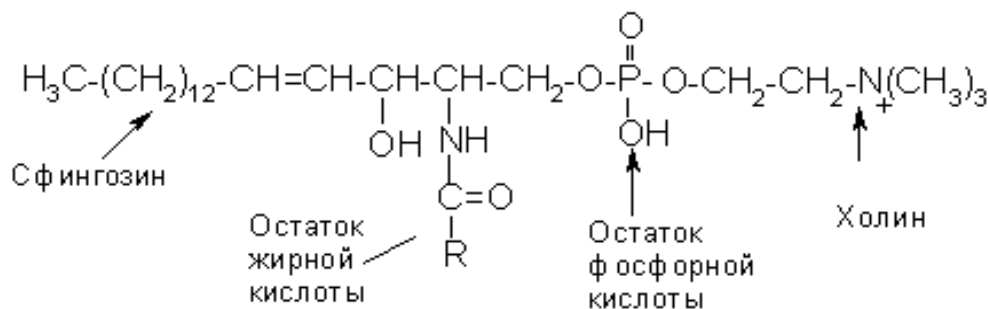
Формулу гліцерофосфоліпідів можна представити так:



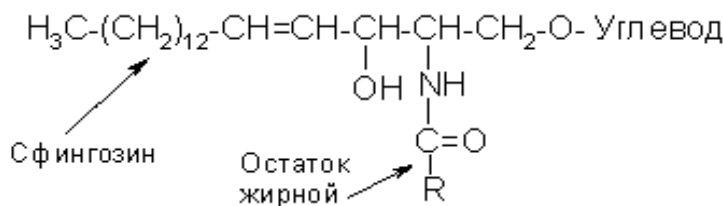
де X – залишок HO-вмісної полярної молекули (полярне угруповування).

Сфінгофосфоліпіди за складом схожі з гліцерофосфоліпіди, але замість гліцерину містять аміноспирт сфінгозин.

Найбільш поширеними сфінгофосфоліпідами є сфінгомієліни. Вони утворені сфінгозином, холіном, жирними кислотами і фосфорною кислотою:



Гліколіпіди містять у своєму складі вуглеводний компонент. До них відносяться глікосфінголіпіди, що містять крім вуглеводу спирт, сфінгозин і залишок жирної кислоти:



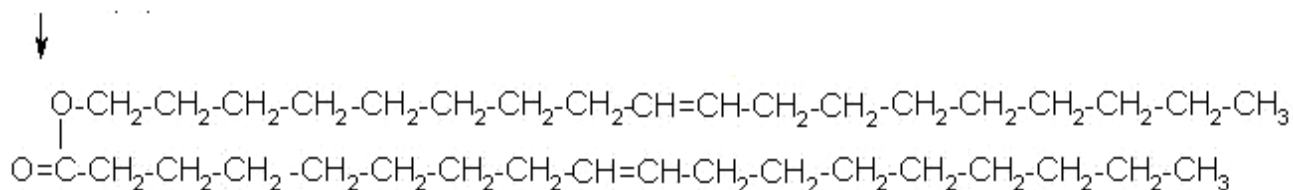
Стероїди є похідними циклопентанпергідрофенантрена. Один з найважливіших представників стероїдів - холестерин. В організмі він зустрічається як у вільному стані, так і в зв'язаному, утворюючи складні ефіри з жирними кислотами.

Воски – це складні ефіри, утворені довголанцюговими жирними кислотами (кількість атомів вуглецю 14 – 36) та довголанцюговими одноатомними спиртами (кількість атомів вуглецю 16 – 22). Як приклад розглянемо формулу воску, утвореного олеїновим спиртом та олеїноювою кислотою:

складноефірний

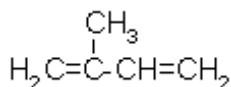
зв'язок

олеїновий спирт

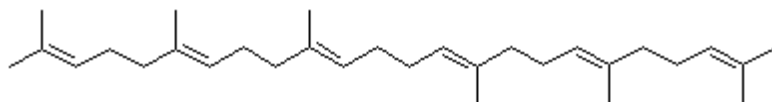


олеїнова кислота

В основі *терпенових сполук* лежать ізопренові залишки:



До терпенів відносяться ефірні масла, смоляні кислоти, каучук, каротини, вітамін А, сквален. Як приклад наведемо формулу сквалена:



Сквален є основним компонентом секрету сальних залоз.

В косметичній промисловості ліпіди використовуються в якості складових для захисту шкіри від передчасного старіння, регенерація та зволоження шкірного

покрову, швидке загоєння опіків, поранень та згрубіlostей шкіри. Тваринні жири використовують в косметичі вибірково через те що вони покривають плівкою шкіру та погіршують її дихання. Але з іншого боку, деякі тваринні жири містять активні речовини, яких бракує в рослинних оліях. Ефірні олії широко використовуються у виробництві косметичних засобів: кремів, сироваток, шампунів. Через високу концентрацію біологічно активних речовин в ефірних оліях вони є дуже затребуваними при виробництві космецевтичної продукції.

В результаті ензимічної і хімічної модифікації в промисловості отримують різні види похідних фосфоліпідів (лецитинів): гідролізовані лецитини, гідроксильовані, ациліровані з різними гідрофільно-ліпофільними характеристиками (ГЛБ від 2 до 12). Вони знайшли широке застосування **в харчовій промисловості** у якості емульгаторів (харчових добавок). Також переестерифікацією жирів у присутності вільного гліцерину отримують моно- та дигліцериди жирних кислот, які також відносяться до харчових добавок-стабілізаторів та емульгаторів.

Лабораторна робота №13

ВИЗНАЧЕННЯ КИСЛОТНОГО ТА ЙОДНОГО ЧИСЕЛ ЖИРУ

Мета роботи - ознайомитися з методом визначення кислотного та йодного чисел жиру.

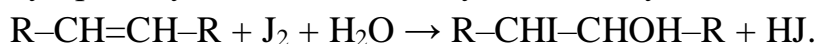
Кислотне число (КЧ) – кількість міліграмів гідроксиду калію КОН, необхідна для нейтралізації вільних жирних кислот, які містяться в 1 г олії або жиру.

Кількість вільних жирних кислот в оліях і жирах залежить від якості сировини, способу отримання олії або жиру, умов їх зберігання. При недотриманні умов та термінів зберігання жирів КЧ збільшується, що обумовлено в основному гідролізом ацилгліцеринів.

Принцип методу заснований на титруванні (нейтралізації) вільних жирних кислот лугом у присутності індикатора.

Йодне число (ЙЧ) – кількість грамів йоду, еквівалентна кількості галогену, що приєднався за місцем подвійних зв'язків до 100 г досліджуваної олії, жиру або жирних кислот. Йодне число виражають у відсотках йоду.

Під час взаємодії галогенів з ненасиченими жирними кислотами до кожного подвійного зв'язку приєднується одна молекула галогену:

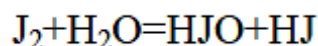


Для кількісного насичення подвійних зв'язків потрібно дотримуватись певних умов – 100 %-вого надлишку галогену, проведення реакції в темряві в колбах з притертими пробками.

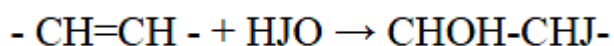
Йодне число кожного жиру коливається в певних межах і є однією з важливих характеристик олій та жирів. За цим показником можна судити про ступінь ненасиченості жиру, здатності його до окислення, висихання, приєднання водню і т.д. Оскільки приєднання йоду відбувається у місці подвійних зв'язків у молекулах ненасичених жирних кислот, йодне число дає уявлення про вміст цих кислот у жирі. Крім того йодне число характеризує ступінь свіжості жирів. *При окисненні жирів ЙЧ зменшується. Чим вище йодне число, тим легше окиснюється жир, тому він більш придатний для виготовлення лаків, фарб, оліфів і менш придатний для вживання в їжу.* ЙЧ використовують для визначення виду жиру, здатності його до «висихання», розрахунку потрібної кількості водню для його гідрогенізації.

В даній лабораторній роботі студенту пропонується визначення ЙЧ жиру прискореними методом - *методом Маргошеса*.

Принцип методу - метод базується на застосуванні йодноватистої кислоти, яка утворюється внаслідок взаємодії йоду з водою за реакцією:



Ця реакція в спиртових розчинах практично не відбувається, але прискорюється наявністю ненасичених зв'язків жирів, особливо при додаванні надлишку води. Йодноватиста кислота реагує з етиленовими зв'язками значно швидше, ніж галогени:



Реактиви та обладнання:

- нейтралізована суміш 96,0 % етилового спирту з етиловим ефіром (1:2).
- спиртовий розчин КОН (0,1 моль/л),
- 1,0 % спиртовий розчин фенолфталеїну;
- етиловий спирт 96,0%;
- спиртовий розчин йоду з масовою часткою йоду 2,5 % (розчин Маргошеса);
- 1,0 % розчин крохмалю;
- водний розчин $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,1 моль/л);
- жир (рослинна олія);
- колби конічні місткістю 100 см³;
- колби мірні зі шліфами на 500 см³;

- дистильована вода;
- пипетки;
- бюретки;
- повітряні холодильники;
- водяна баня;
- секундоміри.

Хід роботи:

Завдання 1. Визначення кислотного числа жиру

В колбу зважують 4 - 5 г олії із записом результату до другого десяткового знака і підливають 50 см³ суміші етилового спирту з етиловим ефіром, додають 3 - 5 крапель розчину фенолфталеїну. Отриманий розчин при постійному перемішуванні титрують з бюретки розчином гідроксиду калію або натрію до отримання слабо-рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 30 с.

Кислотне число (КЧ) обчислюють за формулою:

$$\text{КЧ} = 5,611 \cdot f \cdot V/m,$$

де 5,611 – титр 0,1 N розчину гідроксиду калію, мг/мл;

m – наважка олії (г);

f – поправка на титр розчину КОН (0,1 моль/л);

V – об'єм 0,1 N розчину лугу, витрачене на титрування, см³.

Завдання 2 Визначення йодного числа жиру

У дві сухі колби зважують від 0,1 до 0,15 г рослинної олії, додають 10 см³ етилового спирту, приєднують повітряний холодильник і нагрівають протягом 15...20 хв на водяній бані температурою 50...60 °С. Після цього колбу охолоджують. В охолоджену колбу додають точно 25 см³ спиртового розчину йоду, 200 см³ дистильованої води і секундоміром вимірюють час. Через 5 хв суміш титрують якомога швидше розчином тіосульфату натрію. Спочатку розчин додають до одержання світло-жовтого кольору, потім, додавши кілька крапель крохмалю, суміш титрують до знебарвлення. В аналогічних умовах готують контрольний дослід без наважки жиру.

Йодне число вносять за формулою:

$$\text{ЙЧ} = (V_{\text{к}} - V_{\text{д}}) \cdot f \cdot 0,1269 \cdot 100/m,$$

де (V_к - V_д) – різниця результатів титрування контрольного та дослідного зразків у розчині Na₂S₂O₃ (0,1 моль/л) (мл);

m – наважка жиру (г);

f – поправка на титр розчину Na₂S₂O₃ (0,1 моль/л);

0,1269 – кількість грамів I₂, еквівалентне 1 см³ розчину Na₂S₂O₃ (0,1 моль/л).

Лабораторна робота №14

СПЕЦИФІЧНІ РЕАКЦІЇ З ВИЗНАЧЕННЯ АЛЬДЕГІДІВ ТА СТЕРИНІВ В ЛІПДАХ (РОСЛИННІЙ ОЛІЇ)

Мета роботи – опанувати методики приготування реактиву Шиффа з подальшим визначенням альдегідів в олії та підготовку зразку до проведення реакції Вітбі.

Однією з найбільш специфічних є реакція з фуксінсірчистою кислотою (*реактивом Шиффа*) для визначення альдегідів. Для отримання реактиву Шиффа у 0,5% розчин фуксину додають по краплям сірчисту кислоту або її натрієву сіль до знебарвлення розчину. Отриманий безбарвний розчин фуксінсірчистої кислоти під впливом альдегідів забарвлюється в червоно-фіолетовий або синьо-фіолетовий розчин.

Реактиви та обладнання:

- рослинна олія;
- реактив Шиффа (фуксінсірчаста кислота);
- хлороформ;
- суміш конц. сірчаної кислоти з формаліном (50:1);
- оцтовий ангідрид;
- дистильована вода;
- пробірки;
- піпетки.

Хід роботи:

Завдання 1. Визначення наявності альдегідів в олії.

У пробірку наливають 2 см³ олії та 1 см³ реактиву Шиффа, перемішують. У разі наявності в олії альдегідів досліджувальна рідина набуде червоно-фіолетового забарвлення. Якщо через 20 хв забарвлення не відбувається вважають результат негативним (на наявність альдегідів).

Завдання 2. Визначення стеринів у рослинних оліях.

У суху пробірку наливають 1 см³ хлороформу, додають 3 краплі олії та перемішують для розчинення олії. До хлороформного розчину олії додають 20 крапель суміші конц. сірчаної кислоти з формаліном (50:1) та струшують.

Хлороформний шар забарвлюється у яскравий вишнево-червоний колір, кислотний - у тьмянний червоно-коричневий із зеленою флуоресценцією.

З хлороформного шару відібрати піпеткою кілька крапель та помістити у суху пробірку, додати 2 краплі оцтового ангідриду - з'являється синьо-зелене забарвлення.

Оформлення результатів.

У лабораторний журнал занотуйте проведені досліди та свої спостереження; рекомендовано кожній групі студентів взяти зразки різної олії.

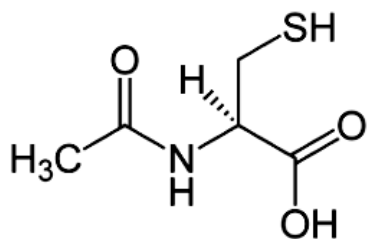
РОЗДІЛ 6. ВІТАМІНИ

Вітаміни - низькомолекулярні органічні речовини різної хімічної природи, з різноманітними фізіологічними властивостями і необхідні організму в мінімальних кількостях. В основному, вони виконують каталітичну функцію (у вигляді кофакторів).

Функції вітамінів. Вітаміни забезпечують нормальний перебіг біохімічних і фізіологічних процесів в організмі. Вони беруть участь в каталізі процесів обміну, оскільки багато які з них містяться в активному центрі ферментів в якості кофакторів.

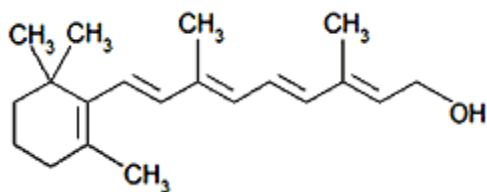
Класифікація вітамінів. Вітаміни поділяють на дві групи за фізико-хімічними властивостями: водорозчинні і жиророзчинні. До водорозчинних належать: В₁ (тіамін), В₂ (рибофлавін), В₃ (РР) (нікотинамід, нікотинова кислота), В₅ (пантотенова кислота), В₆ (піридоксин, піридоксаль, піридоксамін), Н (В₇) (біотин), В₉ (фолієва кислота), В₁₂ (кобаламін), С (аскорбінова кислота). До жиророзчинних належать: А (ретинол), D (кальциферол, холекальциферол), Е (токоферол), К (філохінон).

За раціональною хімічною класифікацією виділяють такі групи вітамінів: 1) вітаміни аліфатичного ряду (В₃, С):



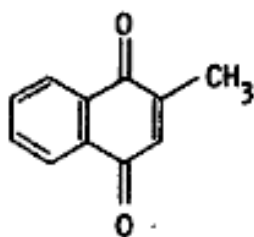
вітамін В₃

2) вітаміни аліцкличного ряду (А, D):



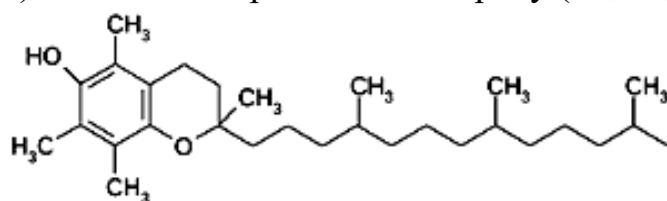
вітамін А

3) вітаміни ароматичного ряду (К):



вітамін К₃

4) вітаміни гетероциклічного ряду (В₁, В₂, В₅, В₆, В₉, В₁₂, Н, Е):



вітамін Е

Цілий ряд харчових продуктів отримують в ході біотехнологічних процесів: хліб і хлібобулочні вироби, вино, пиво, квас, спирт отримують в результаті дріжджового бродіння; сирокочені ковбаси, квашені овочі, кисломолочні продукти утворюються під дією бактерій, а окремі види сирів зобов'язані своїм існуванням цвілевим грибам. Обмін речовин і розвиток клітин мікроорганізмів неможливо без живлення. *Вітаміни* є необхідною умовою розвитку різних мікроорганізмів, так як вони входять до складу коферментів (наприклад, нікотинамід у НАД + і НАДФ +). Найбільш важливими для мікроорганізмів вітамінами є тіамін (В₁), рибофлавін (В₂), піридоксин (В₆), біотин, пантотенова кислота, фолієва кислота і кобаламін (В₁₂). Крім того, вітамін С виконує технологічну функцію антиокиснювача жировмісних продуктів харчування та регулятора кислотності у харчовій системі.

Лабораторна робота № 15

ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ВІТАМІНИ

Мета роботи – опанувати навиками проведення якісних реакцій на вітаміни та описати явища, що спостерігаються.

Реактиви та обладнання:

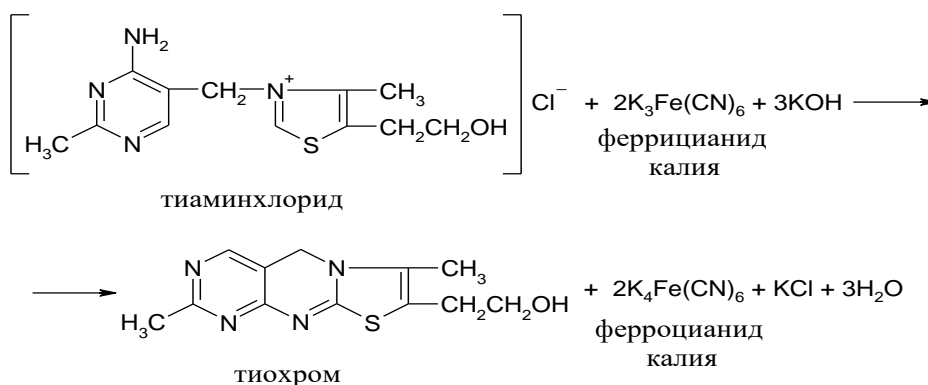
- 10,0 % розчин їдкого натру;
- 5,0 % розчин їдкого натру;
- 5,0 % розчин феррицианіду калію;
- конц.соляна кислота;
- 10,0 % розчин соляної кислоти;
- металевий цинк;
- 5,0 % розчин хлориду заліза;
- 8,0 % розчин ацетату свинцю;
- дистильована вода;
- фруктові соки;
- водні розчини вітамінів В₁, В₂, В₆, С, кверцетину;
- пробірки;
- піпетки.

Хід роботи:

Завдання 1. Визначення вітаміну В₁ (тіаміну)

Реакція окиснення тіаміну феррицианідом калію (красна кров'яна сіль)

У лужному середовищі тіамін окиснюється феррицианідом калію з утворенням забарвленого в жовтий колір тіохрома. Тіохром володіє синьою флуоресценцією при ультрафіолетовому опроміненні розчину в флуороскопі, і ця властивість використовується при кількісному визначенні тіаміну.



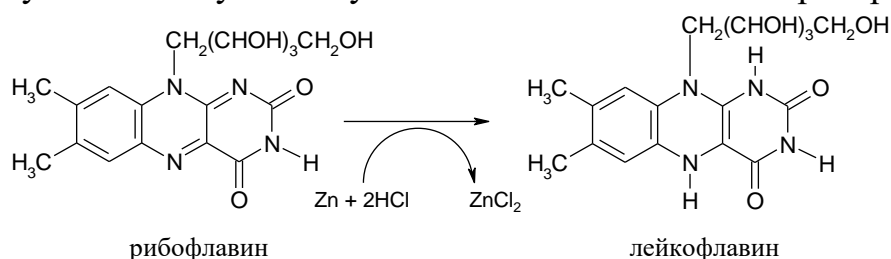
Декілька крапель соку (контроль-1 краплю 5% -го розчину тіаміну) змішують в пробірці з 5-10 краплями 10,0 % розчину гідроксиду натрію і потім додають 1-2 краплі 5,0 % розчину феррицианіду калію. При нагріванні рідина забарвлюється в жовтий колір внаслідок окиснення тіаміну в тіохром.

Завдання 2. Визначення вітаміну В₂ (рібофлавіну)

Реакція відновлення рібофлавіну

Окиснена форма рібофлавіну це речовина жовтого кольору, що флуоресцює в УФ - променях. Рібофлавін легко відновлюється через проміжні сполуки червоного кольору (родофлавін) в безбарвний лейкофлавін. Реакція

обумовлена відновленням рибофлавіну воднем, що утворюється при додаванні металевого цинку до соляної кислоти. При цьому жовте забарвлення розчину переходить в рожеву, потім розчин знебарвлюється. При збовтуванні безбарвного розчину лейкосполука знову окиснюється киснем повітря в рибофлавін:



У пробірку наливають 10 крапель соку (контроль - 1 краплю 5,0 % розчину рибофлавіну), додають 5 крапель концентрованої соляної кислоти і невеликий шматочок металевого цинку. Спостерігають бурхливе виділення бульбашок водню та зміну забарвлення рідини.

Завдання 3. Визначення вітаміну В₆ (піридоксину)

Феррохлоридна проба на вітамін В₆.

При взаємодії піридоксину з хлорним залізом утворюється комплексна сіль типу фенолята заліза ($[\text{Fe}(\text{PhOH})_6]^{3+}$), забарвлена в червоний колір.

У пробірку наливають до 5 см³ соку (контроль - 1 см³ 5,0 % розчину вітаміну В₆), додають 2 краплі 5,0 % розчину хлориду заліза і вміст струшують. Рідина забарвлюється в червоний колір.

Завдання 4. Визначення речовин з Р-вітамінною активністю (флаваноїдів)

Флаваноїди (або біофлаваноїди) відносяться до групи поліфенольних біологічно активних сполук, що володіють високими антиоксидантними, фунгіцидними, кардіопротекторними та іншими властивостями.

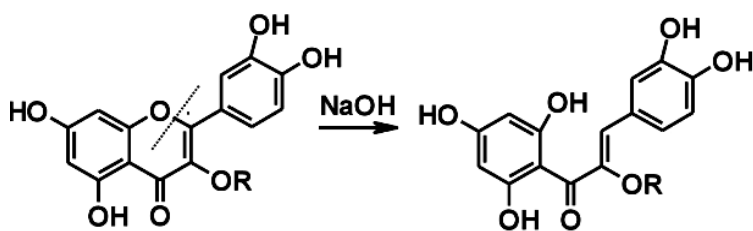
Реакція з хлоридом заліза(III)

Біофлаваноїди утворюють з хлоридом заліза комплексну сполуку, забарвлену в смарагдово-зелений колір. Координаційні зв'язки виникають між іоном заліза і атомами кисню фенольних гідроксильних груп флаваноїду.

До 2,0-3,0 см³ світлого соку (контроль - 1,0-2,0 см³ насиченого водного розчину кверцетину) додають 3-5 крапель 5,0 % розчину хлориду заліза (FeCl_3). З'являється зелене або буро-жовто-зелене забарвлення.

Реакція з гідроксидом натрію

Біофлаваноїди у лужному середовищі гідролізуються, що супроводжується розкриттям піранового циклу та утворення халконів (сполук жовтого або жовто-помаранчевого кольору).

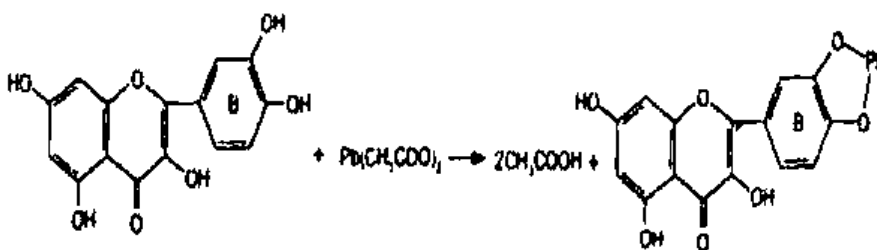


халкон

До 2,0-3,0 см³ темного соку (контроль - 1,0-2,0 см³ насиченого водного розчину кверцетину) додають 3-5 крапель 5,0 % розчину гідроксиду натрію. З'являється насичене жовте або жовто-помаранчеве забарвлення.

Реакція з солями свинцю ($Pb(CH_3COO)_2$)

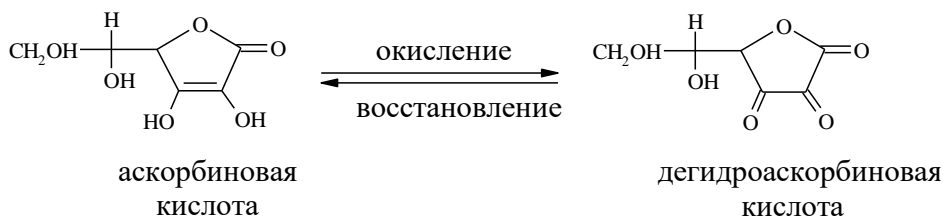
Флаванойди при взаємодії із солями свинцю дають випадіння помаранчевого осаду (визначення фенольних гідроксилів у сполуці).



До 2,0-3,0 см³ соку (контроль - 1,0-2,0 см³ насиченого водного розчину кверцетину) додають 3-5 крапель 8,0 % розчину ацетату свинцю. З'являється осад жовто-помаранчевого забарвлення у випадку наявності фенокисильних гідроксилів у сполуці.

Завдання 5. Визначення вітаміну С (аскорбінової кислоти)

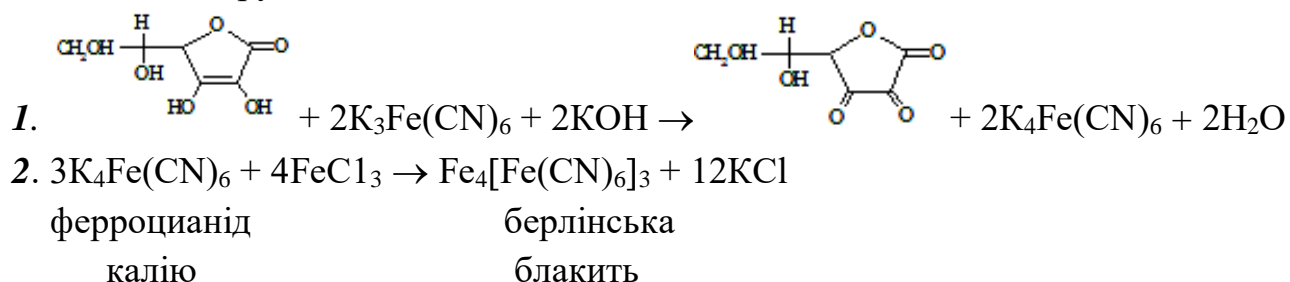
Всі якісні реакції на аскорбінову кислоту засновані на її здатності легко вступати в окиснювально-відновні реакції. Окиснюючись, аскорбінова кислота перетворюється в дегідроаскорбінову, відновлюючи різні сполуки:



Реакція відновлення феррицианиду калію с вітаміном С

Аскорбінова кислота в лужному середовищі відновлює феррицианід калію (красна кров'яна сіль) до ферроцианіда калію (жовта кров'яна сіль), який при взаємодії з хлорним залізом в кислому середовищі утворює погано розчинну у

воді сіль тривалентного заліза - берлінську блакить, яка випадає в осад темно-синього кольору:



В одну пробірку (зразок) вносять 5 крапель 1,0 % розчину вітаміну С, а в іншу (контроль) - 5 крапель дистильованої води. В обидві пробірки додають по 1 краплі 10,0 % розчину гідроксиду калію і 1 краплі 5,0 % розчину ферриціаніду калію, перемішують, після чого додають по 3 краплі 10,0 % розчину соляної кислоти і 1 краплі 1,0 % розчину хлориду заліза (ІІІ). У дослідній пробірці (зразок) випадає темно-синій осад берлінської блакиті, який при обережному нашаровуванні води стає більш виразним.

Аналогічні досліді провести з зразками соків.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Біологічна хімія: [Підручник /Л.М.Вороніна, В.Ф.Десенко, Н.М. Мадієвська та ін.]; за ред. проф. Л.М. Вороніної. - Х.: Основа; Видавництво НФАУ, 2000. - 608 с.
2. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія. Підручник, - "Київський університет", 2008. - 384 с
3. Кейтс М. Техника липидологии /М. Кейтс. – М., 1975.
4. Торчинский Ю.М. Сульфгидрильные и дисульфидные группы в белках / Ю.М. Торчинский. – М.: Наука, 1971. – 228 с.
5. Сучасні методи біохімічних досліджень [Підручник Кучеренко М.Е., Бабенюк Ю.Д., Войціцький В.М.]; Київ. Фітосоціоцентр. 2001. - 424 с.
6. Ещенко Н.Д. Определение активности НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы./ Н.Д. Ещенко, Г.Г. Вольский// Методы биохимических исследований. – Л: ЛГУ, 1982. – С 219 – 222.
7. Ещенко Н.Д. Определение активности сукцинатдегидрогеназы. / Н.Д. Ещенко, Г.Г. Вольский// Методы биохимических исследований. – Л: ЛГУ, 1982. – С. 210–212.
8. Асатиани В.С. Определение малатдегидрогеназы./ В.С. Асатиани // Новые методы биохимической фотометрии. – М.: Наука, 1968. – С.29.
9. Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій сировини [Підручник Остапченко Л.І., Михайлик І.В.]; К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2006. – 215с.
10. Практикум по химии углеводов / Под ред. Ю.А. Жданова. – М.: Высш. школа, 1973. – 204 с.
11. Пустовалова Л.М. Практикум по биохимии / Л.М. Пустовалова. – Ростов-на-Дону: «Феникс», 1999. – 544 с.
12. Храмкина М.Н. Практикум по органическому синтезу / М.Н. Храмкина. – Ленингр.отд-е:Химия,1969. – 328 с.
13. Bernt E., Bergmeyer H.U. α -ketoglutarat U V spectrophotometrische Bestimmung. // Methoden der enzegma tischen analyse. 2 Anflage. Bd III. S.1536 – 1539, 1990, Acaol Verlag,Berlin.
14. Gubler C.J. Studies on the physiological functions of thiamine. The effect of thiamine deficiency and thiamine antagonists on the oxidation of α -keto acids by rat tissues // J. Biol. Chem. – 1961. – Vol.236. – №12. – P. 3112 – 3120.16.
15. Modified Ellman procedure for assay of cholinesterases in crude enzymatic preparation / V. Gorun [ct. al] // Analit. Biochem. – 1978. – Vol. 86. – P. 324–326.
16. Чупахина Г.М. Методы анализа витаминов: практикум / Г.М. Чупахина, П.В. Масленников. – Калининград: Изд-во КГУ, 2004. – 36 с.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
РОЗДІЛ 1. БІЛКИ.....	4
Лабораторна робота № 1. Кольорові реакції на білки.....	5
Лабораторна робота № 2. Реакції осадження білків.....	8
Лабораторна робота № 3. Вилучення казеїну з молока.....	11
Лабораторна робота № 4. Визначення ізоелектричної точки желатину..	12
РОЗДІЛ 2. ФЕРМЕНТИ.....	14
Лабораторна робота № 5. Ферментативний гідроліз крохмалю.....	15
Лабораторна робота № 6. Вплив температури та рН середовища на активність α -амілази.....	17
Лабораторна робота № 7. Визначення активності каталази в картоплі.....	19
РОЗДІЛ 3. НУКЛЕЙНОВІ КИСЛОТИ.....	21
Лабораторна робота № 8. Вилучення нуклеопротейдів з дріжджів.....	22
Лабораторна робота № 9. Гідроліз нуклеопротейдів.....	23
РОЗДІЛ 4. ВУГЛЕВОДИ.....	24
Лабораторна робота № 10. Якісні реакції на вуглеводи.....	26
Лабораторна робота № 11. Хімічні властивості вуглеводів. Загальні та специфічні.....	27
Лабораторна робота № 12. Кількісне визначення вмісту фруктози.....	32
РОЗДІЛ 5. ЛІПІДИ.....	34
Лабораторна робота № 13. Визначення кислотного та йодного чисел жиру.....	37
Лабораторна робота № 14. Специфічні реакції з визначення альдегідів та стеринів у ліпідах (рослинній олії).....	39
РОЗДІЛ 6. ВІТАМІНИ.....	40
Лабораторна робота № 15. Якісні реакції на вітаміни.....	42
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	47

Навчальне видання

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до лабораторних занять з курсу

«Основи біохімії харчових і косметичних виробництв»

для студентів спеціалізації

161.10 « Хімічні технології харчових добавок

і косметичних засобів »

Українською мовою

Укладачі :

АНАН'ЄВА Валерія Вікторівна

БЄЛІНСЬКА Анна Павлівна

ОВСЯННІКОВА Тетяна Олександрівна

ПЕТРОВ Сергій Олександрович

ЖИРНОВА Світлана Вікторівна

Відповідальний за випуск *В.В. Анан'єва*

Роботу до видання рекомендовано *Л.В. Кричковська*

В авторській редакції

Підп. до друку 14.09.2018 р. Формат 60 × 84 ¹/₁₆. Ум. друк. арк.3,1.

Обл.-вид. арк. 3,4 Тираж 100 прим. Замовлення. № 49.

Національний науковий центр,
«Харківський фізико-технічний інститут»
61108, м. Харків, вул. Академічна, 1

